

## ИЗУЧЕНИЕ ОСТРОЙ ТОКСИЧНОСТИ ФАРМАЦЕВТИЧЕСКОЙ СУБСТАНЦИИ ЛЕКАРСТВЕННОГО СРЕДСТВА, ЯВЛЯЮЩЕГОСЯ МОДУЛЯТОРОМ MGLUR4 РЕЦЕПТОРОВ, РАПИТАЛАМ

<sup>1</sup>Авдеева Н.В., <sup>1</sup>Покровский М.В., <sup>1</sup>Корокин М.В.

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

Проведено экспериментальное исследование острой токсичности фармацевтической субстанции препарата Рапиталам, который является модулятором метаботропных рецепторов глутамата. Исследование проводилось на базе центра доклинических исследований Белгородского государственного Национального исследовательского университета. Определение острой токсичности проводили на аутбредных белых мышах и белых лабораторных крысах при внутрижелудочном и внутрибрюшинном введении. Все животные были разделены на экспериментальные и контрольную группы. Для определения среднесмертельной дозы раствор исследуемого потенциального лекарственного средства вводили мышам и крысам однократно внутрижелудочно в дозах 1600, 1800, 2000, 2200 и 2400 мг/кг и 1300, 1400, 1500, 1600 и 1700 мг/кг соответственно. Внутрибрюшинно мышам и крысам рапиталам вводили в дозах 1300, 1400, 1500, 1600 и 1700 мг/кг и 900, 1000, 1100, 1200 и 1300 мг/кг соответственно. Контрольной группе животных вводили эквивалентное количество растворителя, используемого для приготовления раствора исследуемого препарата. Проведенные исследования свидетельствуют о хорошей переносимости доз потенциального лекарственного средства, многократно превосходящих терапевтическую. Согласно классификации К.К. Сидорова фармацевтическую субстанцию потенциального лекарственного средства Рапиталам следует отнести к малотоксичным препаратам.

Ключевые слова: Рапиталам, острая токсичность, болезнь Паркинсона, метаботропные рецепторы глутамата, модуляторы mGluR4 рецепторов.

## THE STUDY OF THE ACUTE TOXICITY OF THE PHARMACEUTICAL SUBSTANCE OF THE DRUG RAPITALAM, THE MGLUR4 RECEPTORS MODULATOR

<sup>1</sup>Avdeeva N.V., <sup>1</sup>Pokrovskiy M.V., <sup>1</sup>Korokin M.V.

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

The article presents the results of the experimental research of the acute toxicity of the pharmaceutical substance of the drug Rapitalam, which is a modulator of metabotropic glutamate receptors. The study was conducted at the centre for preclinical studies, Belgorod National Research University. Acute toxicity was studied on nonlinear white mice-males and white rats upon intragastric and venturpoint introduction. All mice were divided into experimental and control groups. To determine the median lethal dose of the solution of the test drug was administered to the mice and white rats one time intragastrically at doses of 1600, 1800, 2000, 2200 and 2400 mg/kg. and 1300, 1400, 1500, 1600 и 1700 mg/kg. respectively. Rapitalam was administered to the mice and rats Intraperitoneal at doses of 1300, 1400, 1500, 1600 and 1700 mg/kg and 900, 1000, 1100, 1200, and 1300 mg/kg, respectively. The control group animals were given an equivalent amount of the solvent used to prepare the solution of the studied drug. The research has shown a good tolerability of the drug doses several times exceeding the therapeutic dose. According to K.K. Sidorov's classification, pharmaceutical substance of the drug Rapitalam should be attributed to low-toxic drugs.

Keywords: rapitalam, acute toxicity, parkinson's disease, metabotropic glutamate receptors, the mglur4 receptors modulator.

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 просто не способен осуществлять обратный захват нейромедиатора в клетку. Таким образом, 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 [1]. Глутаматэргическая система играет роль ключевого звена во множестве неврологических и психиатрических заболеваний – у более чем 30 нозологических единиц заболеваний доказана роль нарушений метаболизма глутамата в процессе патогенеза [2].

Рецепторы глутамата подразделяются на 2 основные группы: ионотропные и metabotropные. К ионотропным (т.е. представляющим собой ионный канал) рецепторам отнесли NMDA, AMPA и каинатные [3]. К metabotropным – все остальные, которые разделили на 3 группы в зависимости от наблюдаемых при возбуждении эффектов.

Более подробно остановимся на metabotropных рецепторах глутамата. Данная группа рецепторов при активации не «открывается» для тока ионов через мембрану нейрона, а оказывает своё действие опосредованно – через цепи внутриклеточных сигнальных веществ – вторичных мессенджеров. Metabotropные рецепторы активируются более низкими концентрациями глутамата, чем основные ионотропные AMPA-рецепторы. Кроме того, их активация потенцирует токи NMDA-рецепторов в стриатуме и гипоталамическом ядре. Антагонисты этих рецепторов могли бы иметь антипаркинсонический эффект за счет снижения возбуждения в гиперактивных паркинсонизмом базальных ганглиях. Metabotropные рецепторы глутамата (mGluR) делятся на три группы (mGluRI, mGluRII и mGluRIII), хотя и обнаружено восемь различных генов, которые их кодируют (mGluRI включают mGluR1 и -5, mGluRII – mGluR2 и -3, mGluRIII – mGluR4, -6, -7) [4]. Группы рецепторов различаются по механизму действия. Рецепторы первой группы связаны с Gq-белком. Остальные группы глутаматных рецепторов, вторая и третья, осуществляют своё действие через Gi-белок. Это означает, что при активации этих рецепторов блокируется работа аденилатциклазы, которая в активном состоянии превращает АТФ в цАМФ. Следовательно, останавливается работа цАМФ-зависимой протеинкиназы (второе название – протеинкиназа А, PKA), и каскад реакций фосфорилирования, изменяющих гомеостаз кальция, не запускается [2].

В последние 20 лет было проведено множество исследований, доказывающих, что блокаторы глутаматных рецепторов могут выступать в качестве лекарственных препаратов болезни Паркинсона, как в комбинациях с леводопой, так и самостоятельно.

Физиологические исследования на срезах мозга крыс показали, что селективный агонист mGluRIII (L-AP4) снижает синаптическую передачу в стриатопалидальном и гипоталамо-нигральном синапсах. Также микродиализные исследования показали, что L-AP4 и L-SOP уменьшают высвобождение гамма-амино-масляной кислоты в бледном шаре у крыс. Эти данные позволяют предположить, что активация mGluRIII может облегчить двигательную симптоматику болезни Паркинсона либо путем снижения активности

косвенного пути, либо путем уменьшения активности гипоталамического ядра [5, 8]. L-AP4 может быть весьма эффективным при лечении симптомов болезни Паркинсона, поскольку он действует на асимметрию передних конечностей, вызванную 6-гидроксидопамином у крыс в той же степени, что и L-ДОФА. Интрапаллиадные инфузии L-SOP облегчают резерпин-индуцированные акинезии у крыс, что подтверждает гипотезу о том, что уменьшение активности этих синапсов может иметь терапевтическую эффективность.

Рецепторы глутамата могут быть весьма перспективными мишенями для лечения неврологических и психических осложнений, связанных с болезнью Паркинсона, таких как беспокойство, депрессия и когнитивные нарушения [5].

Изучение блокаторов глутаматных рецепторов является важной целью, при поиске новых фармакологических средств, для лечения болезни Паркинсона. Селективность новых соединений является ключевой их особенностью.

**Целью исследования:** доклиническое изучение острой токсичности фармацевтической субстанции потенциального лекарственного средства, являющегося модулятором mGluR4 рецепторов Рапиталам в опытах на животных.

#### **Материалы и методы**

Определение острой токсичности проводили на аутбредных белых мышах (самцы и самки в соотношении 50/50) массой 18-22 г и белых лабораторных крысах массой 180-220 г (самцы и самки в соотношении 50/50) при внутрижелудочном и внутрибрюшинном введении. Источник животных – питомник Белгородского государственного университета. Животных содержали в соответствии с действующими Санитарными правилами по устройству, оборудованию и содержанию экспериментально-биологических клиник в условиях центра доклинических исследований НИУ БелГУ, на стандартной диете, при 12-часовом световом режиме, в условиях свободного доступа к воде и пище. Все особи были рандомизированно распределены на 24 группы по 10 особей. Все животные содержались в контролируемых условиях окружающей среды (18-26 °С и 30-70%-ная относительная влажность воздуха). В комнатах содержания животных поддерживался 12-часовой цикл освещения и по крайней мере 10-кратная смена объема воздуха комнаты в час. Животных содержали в клетке по 5 особей. Клетки оборудованы стальными решетчатыми крышками с кормовым углублением, стальным разделителем для корма [7,8].

До начала исследования в течение 10 дней осуществлялся ежедневный осмотр внешнего состояния животных. Животные с обнаруженными в ходе осмотра отклонениями в эксперимент включены не были. Далее все животные были разделены на группы 2 типов – экспериментальные и контрольные. Каждому животному, включенному в исследование, был

присвоен индивидуальный номер. По окончании эксперимента проводили эвтаназию путем передозировки этиловым эфиром с последующим обескровливанием [7,8].

Для определения среднесмертельной дозы раствор исследуемого лекарственного средства, являющегося модулятором  $m$  GluR4 рецепторов Рапиталам (ООО «Наноапатит», Россия, аналитический лист от 24.10.2016), вводили мышам однократно внутрижелудочно в дозах 1600, 1800, 2000, 2200 и 2400 мг/кг. Путь введения соответствует таковому при планируемом клиническом применении препаратов у человека. Кроме того, проведено исследование острой токсичности на мышах при внутрибрюшинном введении в дозах 1300, 1400, 1500, 1600 и 1700 мг/кг. Наблюдение за животными проводили в течение 14 дней.

Для определения среднесмертельной дозы на крысах (животные, на которых показана фармакологическая активность разрабатываемого лекарственного средства) раствор Рапиталама вводили белым лабораторным крысам однократно внутрижелудочно в дозах 1300, 1400, 1500, 1600 и 1700 мг/кг. Кроме того, проведено исследование острой токсичности на крысах при внутрибрюшинном введении в дозах 900, 1000, 1100, 1200 и 1300 мг/кг. Наблюдение за животными проводили в течение 14 дней.

Контрольным группам животных вводили эквивалентное количество растворителя, используемого для приготовления раствора исследуемого препарата. В качестве такого растворителя использован 1%-ный крахмальный раствор при внутрижелудочном введении и 0,9%-ный раствор NaCl при внутрибрюшинном введении.

При изучении «острой» токсичности клиническое наблюдение за каждым животным проводили в течение первых суток после введения препарата, ежедневно в течение последующих 14 дней. Фиксировали и отражали в первичной документации общее состояние животных: особенности их поведения, интенсивность и характер двигательной активности, наличие и характер судорог, координацию движений, тонус скелетных мышц, реакцию на тактильные, болевые, звуковые и световые раздражители, частоту и глубину дыхательных движений, состояние волосяного и кожного покрова, органов чувств, положение хвоста, количество и консистенцию фекальных масс, частоту мочеиспускания и окраску мочи. Производился подсчет количества погибших животных в ходе эксперимента.

### **Результаты исследования**

О токсическом действии препарата судили по общему состоянию животных и их выживаемости. Подсчет выживших и погибших животных проводился в течение 14 суток после затравки препаратами, с последующим наблюдением за выжившими животными в течение двух недель после затравки. На основании проведенных экспериментальных данных по методу Б.М. Штабского рассчитаны LD50, LD16 и LD84 при внутрижелудочном и

внутрибрюшинном введении мышам и крысам.

Проведенные исследования показали, что после однократного введения мышам и крысам исследуемого препарата в вышеописанных дозах в группах экспериментальных животных отмечалась гибель животных. Пик смертности пришелся на 6-14 часов после внутривентрикулярного введения препарата. В последующий период наблюдения гибели животных не отмечалось ни в одной из экспериментальных групп.

Через 15-30 минут после внутривентрикулярного введения препарата животные становились вялыми, малоподвижными, отказывались от пищи и воды, учащалось дыхание. Через 30-60 минут животные впадали в состояние ступора со снижением частоты дыхания, полным отсутствием движений. Указанное состояние длилось до 24 часов, в последующем животное или погибало, или возвращалось к активной жизнедеятельности. Полное восстановление поведенческих реакций животных отмечалось в течение следующих 24 часов после выхода из состояния ступора. Полученные данные представлены в таблицах 1-4.

Таблица 1

**Данные, характеризующие токсичность Рапиталама в острых опытах на белых мышах (внутрижелудочно)**

Группа животных	Доза мг/кг	Число животных			Летальность, %	LD <sub>16</sub> мг/кг	LD <sub>50</sub> мг/кг	LD <sub>84</sub> мг/кг
		Общие	Погибшие	Выжившие				
1%-ный крахмальный раствор	0	10	0	10	0	Не определяется		
Рапиталам	1600	10	0	10	0	1840	2066±107	2293
Рапиталам	1800	10	3	7	30			
Рапиталам	2000	10	4	6	40			
Рапиталам	2200	10	7	3	70			
Рапиталам	2400	10	10	0	100			

Таблица 2

**Данные, характеризующие токсичность Рапиталама в острых опытах на белых мышах (внутрибрюшинно)**

Группа животных	Доза мг/кг	Число животных			Летальность, %	LD <sub>16</sub> мг/кг	LD <sub>50</sub> мг/кг	LD <sub>84</sub> мг/кг
		Общие	Погибшие	Выжившие				
1%-ный крахмальный раствор	0	10	0	10	0	Не определяется		
Рапиталам	1300	10	0	10	0	1384	1481±46	1578
Рапиталам	1400	10	2	8	20			

Рапиталам	1500	10	6	4	60			
Рапиталам	1600	10	9	1	90			
Рапиталам	1700	10	10	0	100			

Таблица 3

**Данные, характеризующие токсичность Рапиталама в острых опытах на крысах  
(внутрижелудочно)**

Группа животных	Доза мг/кг	Число животных			Летальность, %	LD <sub>16</sub> мг/кг	LD <sub>50</sub> мг/кг	LD <sub>84</sub> мг/кг
		Общие	Погибшие	Выжившие				
1%-ный крахмальный раствор	0	10	0	10	0	Не определяется		
Рапиталам	1300	10	1	9	10	1296	1522±107	1749
Рапиталам	1400	10	3	7	30			
Рапиталам	1500	10	5	5	50			
Рапиталам	1600	10	6	4	60			
Рапиталам	1700	10	8	2	80			

Таблица 4

**Данные, характеризующие токсичность Рапиталама в острых опытах на крысах  
(внутрибрюшинно)**

Группа животных	Доза мг/кг	Число животных			Летальность, %	LD <sub>16</sub> мг/кг	LD <sub>50</sub> мг/кг	LD <sub>84</sub> мг/кг
		Общие	Погибшие	Выжившие				
1%-ный крахмальный раствор	0	10	0	10	0	Не определяется		
Рапиталам	900	10	0	10	0	984	1081±46	1178
Рапиталам	1000	10	2	8	20			
Рапиталам	1100	10	6	4	60			
Рапиталам	1200	10	9	1	90			
Рапиталам	1300	10	10	0	100			

На основании проведенных экспериментальных данных по методу Б.М. Штабского рассчитаны LD<sub>50</sub>, LD<sub>16</sub> и LD<sub>84</sub> фармацевтической субстанции потенциального лекарственного средства Рапиталам при внутрижелудочном и внутрибрюшинном введении мышам и крысам. Согласно классификации К.К. Сидорова, фармацевтическую субстанцию потенциального лекарственного средства Рапиталам следует отнести к малотоксичным препаратам.

При гибели животных после введения исследуемого препарата производили вскрытие животных во всех экспериментальных группах для макроскопической оценки состояния внутренних органов.

При визуальном осмотре грудной и брюшной полостей погибших животных всех групп макроскопически различимых изменений не обнаружено. Патологического содержимого в грудной и брюшной полостях не было. Статистически значимого негативного действия на массу тела экспериментальных животных не обнаружено. Мыши и крысы в экспериментальных группах с ровным шерстным покровом, чистыми кожными покровами и видимыми слизистыми, с умеренно развитым подкожно-жировым слоем.

По результатам вскрытия и макроскопического исследования внутренних органов умерших экспериментальных животных, получавших Рапиталам в исследуемом диапазоне доз, каких-либо патологических изменений не было обнаружено.

Общая морфологическая картина состоит в следующем.

*ЯЗЫК.* Язык чистый.

*ПИЩЕВОД.* Слизистая пищевода серого цвета, гладкая, блестящая.

*ЖЕЛУДОК.* Желудок с хорошо выраженными складками слизистой. Слизистая серого цвета, влажная, блестящая.

*ПЕЧЕНЬ.* Плотная с гладкой поверхностью, на разрезе красно-коричневого цвета.

*ТОЛСТЫЙ И ТОНКИЙ КИШЕЧНИК.* Содержимое кишечника соответствует каждому из его отделов. Слизистая его образует поперечные складки, влажная, серого цвета.

*СЛИЗИСТЫЕ ГОРТАНИ, ТРАХЕИ, ГЛАВНЫХ БРОНХОВ* розового цвета, гладкие, влажные, блестящие.

*СЕРДЦЕ.* Округлой формы, хорошо сокращено. Под эпикардом обычный венозный рисунок расположения коронарных сосудов. Створки клапанов тонкие, полупрозрачные. Эндокард гладкий, блестящий. Аорта эластичная, интима ее чистая, гладкая.

*ПОЧКИ.* Капсула почек снимается легко, под ней гладкая поверхность почек, на разрезе почки умеренного кровенаполнения с четким делением на слои. Слизистая лоханок, мочевого пузыря серого цвета, влажная, блестящая.

*СЕЛЕЗЕНКА.* Селезенка с гладкой капсулой, на разрезе серо-красного цвета, пульпа соскоба не дает.

*ГОЛОВНОЙ МОЗГ.* Оболочки мозга полупрозрачные, гладкие, блестящие. Извилины мозга хорошо выражены. На разрезе вещество мозга влажное, блестящее, с симметричным рисунком строения. Сосуды основания мозга расположены симметрично, со спавшимися стенками.

Органы грудной и брюшной полостей расположены правильно. Полости свободны от

жидкостей и спаек.

*ЛЕГКИЕ.* Легкие воздушные, серо-розового цвета, покрыты тонкой плеврой, нижние доли с неравномерным кровенаполнением.

*НАДПОЧЕЧНИКИ.* Надпочечники округлой формы, с четким делением паренхимы на корковую и мозговую зоны.

### **Выводы**

1. Доклиническое изучение острой токсичности фармацевтической субстанции лекарственного средства Рапиталам, являющегося модулятором mGluR4 рецепторов, в опытах на животных позволило выявить среднесмертельную дозу (ЛД50) препарата. ЛД50 при внутрижелудочном введении мышам составляет 2066 мг/кг, при внутрибрюшинном введении мышам – 1481 мг/кг. ЛД50 при внутрижелудочном введении крысам составляет 1522 мг/кг, при внутрибрюшинном введении мышам – 1081 мг/кг.
2. Согласно классификации К.К. Сидорова, фармацевтическую субстанцию потенциального лекарственного средства Рапиталам следует отнести к малотоксичным препаратам.

### **Список литературы**

1. Petroff O.A. GABA and glutamate in the human brain // *Neuroscientist*. – 2002. – № 8 (6). – P. 562-731.
2. The glutamate story // *Br J. Pharmacol*. – 2006. – № 147. - Vol. 1. – P. 100-8.
3. Blanpied T.A., Clarke R.J., Johnson J.W. Amantadine inhibits NMDA receptors by accelerating channel closure during channel block // *J. Neurosci*. – 2005. – № 25. – P. 3312-3322.
4. 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.
5. 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.
6. 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.
7. Gonder J.C., Laber K. A renewed look at laboratory rodent housing and management // *ILAR J*. – 2007. – № 48 (1). - P. 29-36.
8. Guide for the care and use of laboratory animals. – Washington D.C.: National Academy press [Электронный ресурс]. – Режим доступа:



<http://www.cpp.edu/~research/acuc/doc/guide%20to%20use%20lab%20animals.pdf>  
обращения 15.04.2017).

(дата