

ДОКЛИНИЧЕСКИЕ ИССЛЕДОВАНИЯ РЕПРОДУКТИВНОЙ ТОКСИЧНОСТИ, МУТАГЕННОСТИ И КАНЦЕРОГЕННОСТИ ПОТЕНЦИАЛЬНОГО ЛЕКАРСТВЕННОГО СРЕДСТВА НА ОСНОВЕ ПЕПТИДЭРГИЧЕСКОГО НЕЙРО- И СТРЕСС-ПРОТЕКТОРА

Колобов А.А., Смирнова М.П., Кампе-Немм Е.А., Шпень В.М., Вирцев А.А., Варюшина Е.А., Александров Г.В., Захаров М.С., Кирьянова А.С., Хуттунен О.Э., Румянцева А.Б., Митрофанов И.Д., Бендт И.В., Крылова А.Э., Чистякова А.Б.

ФГУП «Государственный научно-исследовательский институт особо чистых биопрепаратов» ФМБА России, Санкт-Петербург, e-mail: a.a.kolobov@hpb.spb.ru

Цель работы заключалась в исследованиях специфических видов токсичности потенциального лекарственного средства (ЛС) «Лизаргам, спрей назальный, дозированный». Проведенные исследования показали, что активный фармакологический ингредиент «Лизаргама», N α -ацетил-D-лизил-лизил-аргинил-аргинил-амид, обладает нейропротекторным действием, нормализует уровни цитокинов и ограничивает развитие апоптоза в головном мозге. Защитное действие пептида характеризуется также нейротрофическим компонентом. В статье приведены результаты изучения репродуктивной токсичности и эмбриотоксического действия потенциального ЛС в системе *in vivo*. Также оценивали возможную мутагенность и риск канцерогенного действия ЛС «Лизаргам» в тестах *in vitro* и *in vivo*. По результатам исследований, после применения ЛС «Лизаргам» не наблюдали изменений в показателях генеративной функции у крыс, а также не выявили негативного воздействия на развитие потомства, полученного от самок крыс, получавших препарат. Согласно полученным данным тестов *in vitro* и *in vivo*, было показано отсутствие мутагенного действия потенциального ЛС. По результатам исследований также можно заключить, что применение ЛС «Лизаргам» безопасно в плане возможного канцерогенного действия. Результаты проведенной работы могут быть использованы в дальнейших исследованиях потенциального ЛС «Лизаргам».

Ключевые слова: доклинические исследования, репродуктивная токсичность, эмбриотоксическое действие, мутагенность, канцерогенность, пептидэргический нейропротектор.

PRECLINICAL STUDIES OF REPRODUCTIVE TOXICITY, MUTAGENICITY AND CARCINOGENICITY OF A POTENTIAL DRUG BASED ON PEPTIDERGIC NEURO- AND STRESS PROTECTOR

Kolobov A.A., Smirnova M.P., Kampe-Nemm E.A., Shpen' V.M., Virtsev A.A., Varyushina E.A., Alexandrov G.V., Zakharov M.S., Kiryanova A.S., Khuttunen O.E., Rumyantseva A.B., Mitrofanov I.D., Bendt I.V., Krylova A.E., Chistyakova A.B.

State Research Institute of Highly Pure Biopreparations, Saint Petersburg, e-mail: a.a.kolobov@hpb.spb.ru

The aim of this work was studies of specific types of toxicity of potential drug "Lizargam, nasal spray, dosed". Previous studies of the specific pharmacological activity of the Lizargam drug showed that the active pharmacological ingredient of the drug, N α -acetyl-D-lysyl-lysyl-arginyl-arginyl amide, has a neuroprotective effect, normalizes the levels of cytokines, and limits the development of apoptosis in the brain. The protective effect of the peptide it is also characterized by a neurotrophic component. The results of study of reproductive toxicity and embryotoxic effect of the drug, as well as of possible mutagenicity and the risk of carcinogenic activity are presented. According to the results of studies, after the use of the «Lizargam», no changes in the parameters on the generative function in rats were observed, and also no negative impact on the development of the next generation obtained from female rats treated with the drug were detected. According to the received results of *in vitro* and *in vivo* tests the absence of the mutagenic effect of potential drugs was showed. Also, based on the data obtained, it can be concluded that the potential drug "Lizargam" is safe in terms of a possible carcinogenic effect. The results of the presented work can be used in further studies of «Lizargam».

Keywords: preclinical studies, reproductive toxicity, embryotoxicity, mutagenicity, carcinogenicity, peptidergic neuroprotector.

В последнее время наблюдается увеличение числа сосудистых заболеваний и цереброваскулярных нарушений центральной нервной системы. В лечении данных патологий важная роль принадлежит церебропротекторным, ноотропным и стресс-протекторным препаратам.

В данной работе приведены результаты исследований репродуктивной токсичности и эмбриотоксического действия, а также оценки возможного мутагенного и канцерогенного действия потенциального ЛС для лечения нарушений мозгового кровообращения - «Лизаргам, спрей назальный дозированный» (далее препарат «Лизаргам»).

Исследования показали, что активный фармакологический ингредиент препарата «Лизаргам» (N α -ацетил-D-лизил-лизил-аргинил-аргинил-амид) обладает нейропротекторным действием [1]. Введение препарата нормализует уровни цитокинов в головном мозге, а также обладает антиапоптотическим действием, поскольку может ограничивать развитие апоптоза в головном мозге после воздействия оксида углерода. Защитное действие исследуемого пептида характеризуется также нейротрофическим компонентом. Таким образом, препарат «Лизаргам» обладает высокой нейропротекторной эффективностью *in vivo*.

Материалы и методы исследования

В данной работе использовали готовую лекарственную форму (ГЛФ) «Лизаргам, спрей назальный дозированный 0,5% и 1,0%». Подробная характеристика ГЛФ приведена нами ранее [2]. Терапевтическую дозу препарата для человека (20 мг/кг) высчитывали в соответствии с руководством Т.А. Гуськовой [2; 3].

Животные содержались в виварии согласно санитарно-эпидемиологическим требованиям от 29.08.2014 г., условия соответствовали Европейской конвенции по защите позвоночных животных (Страсбург, 1986 г.). Эксперименты проводились с разрешения биоэтической комиссии института. В качестве контроля во всех экспериментах использовали физиологический раствор (стерильный 0,9% раствор хлорида натрия, ФР).

Оценку репродуктивной токсичности (генеративной функции) проводили на белых беспородных крысах обоего пола (180-200 г, 9-10 недель) [4; 5]. Препарат «Лизаргам» вводили самкам (n=20) ежедневно интраназально (и/н) в дозе 5 мг/кг (максимальная доза, использованная в эксперименте по изучению хронической токсичности) в течение 15 дней (3 эстральных цикла). Самцам препарат вводили (n=10) и/н в дозе 5 мг/кг в течение всего периода сперматогенеза (48 дней). После введения препарата самок помещали с самцами на 2 эстральных цикла (10 дней). Взвешивание крыс проводили до начала эксперимента (фоновые значения), после завершения введения препарата и перед эвтаназией (самки). Забой и морфологическое исследование репродуктивной системы самок проводили на 20-й

день после оплодотворения. Состояние внутренних органов и костной системы плодов исследовали по методу Вильсона или по модифицированному методу Даусона [4].

Исследование эмбриотоксического действия препарата проводили в 2 этапа [4; 6; 7]. Спаривание виргинных самок осуществляли с интактными самцами. На первом этапе препарат и/н вводили двум опытным группам самок по 15 особей с 1-го по 19-й день беременности: в 1-й группе - в дозе 1 мг/кг (10-кратная предполагаемая терапевтическая доза для человека с учетом коэффициента пересчета на площадь поверхности тела крыс, равного 6); во 2-й группе - в дозе 5 мг/кг. В контрольной группе самкам (n=15) в эти сроки вводили ФР. Вскрытие самок проводили после эвтаназии на 20-й день беременности, при этом определяли показатели репродуктивной системы самок и состояния плодов.

На втором этапе препарат вводили и/н одной группе самок (n=15) в дозе 5 мг/кг с 1 по 21-й день беременности, в контрольной группе самкам (n=15) в эти же сроки вводили ФР. На 4, 7, 14 и 21-й дни после рождения у 8 крысят из каждого помета проводили оценку физического развития неполовозрелого потомства. На 2-6-й дни изучали скорость созревания сенсорно-двигательных рефлексов крысят, а на 30-й день - эмоционально-двигательное поведение по методу «открытое поле».

При изучении генотоксичности руководствовались рекомендациями действующих методических документов [4; 8]. Мутагенные свойства препарата «Лизаргам» изучали *in vitro* с использованием чашечного метода учета мутаций в тесте Эймса.

Мутагенность и риск канцерогенного действия препарата «Лизаргам» изучали *in vivo* в 2 сериях экспериментов на белых беспородных мышах и мышах-гибридах F1(СВА х С57В1) обоего пола. Проводили оценку хромосомных aberrаций в клетках красного костного мозга (ККМ). В первой серии экспериментов были сформированы три группы по 5 самцов. В 1-й (опытной) группе «Лизаргам» вводили однократно и/н в дозе 6 мг/кг; во 2-й группе (негативный контроль) - по той же схеме вводили ФР; в 3-й группе (позитивный контроль) в те же сроки однократно, внутрибрюшинно (в/б) вводили циклофосфамид в дозе 20 мг/кг. Во второй серии экспериментов в двух группах (опытная и контрольная) было по 5 самцов и по 5 самок. В опытной группе препарат вводили и/н в дозе 6 мг/кг ежедневно 5 дней. Через 24 часа после введения «Лизаргама» после эвтаназии у мышей получали ККМ для исследований.

Проводили изучение индукции доминантных летальных мутаций в зародышевых клетках мышей (СВА х С57В1). В опытной и контрольной группах было по 15 самцов. В опытной группе «Лизаргам» вводили и/н в дозе 6 мг/кг однократно. К каждому самцу подсаживали по 3 интактных виргинных самки, затем заменяли новыми через 7 дней. На 15-

17-й день беременности после эвтаназии самок вскрывали. Уровень постимплантационных потерь (А) подсчитывали по формуле:

$$A = \frac{d}{I+d}, \text{ где } d - \text{ число погибших эмбрионов, } I - \text{ число выживших эмбрионов.}$$

Статистическую обработку проводили в программе Microsoft Excel-2007. Полученные данные представляли в виде средних значений и ошибок среднего ($M \pm m$). Различия между группами оценивали с помощью Т-критерия Стьюдента, а также теста Манна-Уитни.

Результаты исследования и их обсуждение

1. Оценка репродуктивной токсичности

1.1. Генеративная функция

После введения препарата ни в одной из групп не наблюдалось гибели крыс. Не происходило снижение прироста массы тела, а также не было выявлено изменений в поведении животных. При изучении репродуктивной системы у самок не было обнаружено никаких патологических изменений. В каждой из групп было по 18 беременных самок, при этом индекс фертильности составил 90% и в опытной, и в контрольной группе. Результаты оценки параметров репродуктивной системы самок приведены на рисунке 1.

Количество резорбций не отличалось в контрольной и опытной группах (всего 4 и 5; $0,22 \pm 0,13\%$ и $0,28 \pm 0,19\%$ соответственно). Предимплантационная гибель составила в контрольной - $1,02 \pm 0,70$, в опытной группе - $1,12 \pm 0,79$, а постимплантационная - $2,36 \pm 1,40$ и $2,40 \pm 1,67$ соответственно. Таким образом, показатели предимплантационной и постимплантационной потерь также были близкими в обеих группах. При исследовании состояния плодов в обеих группах не было выявлено значительных различий. Так, средний вес составил в контрольной группе $3,15 \pm 0,04$ г, а в опытной группе - $3,12 \pm 0,03$ г, краниокаудальный размер плодов был в среднем $34,09 \pm 0,12$ и $34,12 \pm 0,13$ мм соответственно. При внешнем обследовании 164 плодов в контрольной и 162 в опытной группе не было выявлено никаких аномалий развития. При изучении развития внутренних органов у 82 плодов в контрольной и 81 в опытной группе, а также состояния костного скелета также не обнаружено патологий развития. Число центров оссификации метакарпальных (справа $3,66 \pm 0,07$; слева $3,59 \pm 0,05$) или метатарзальных (справа $3,63 \pm 0,09$; слева $3,57 \pm 0,05$) в контрольной группе значительно не различалось от таковых в опытной группе (метакарпальных - справа $3,64 \pm 0,06$; слева $3,60 \pm 0,05$ или метатарзальных - справа $3,67 \pm 0,05$; слева $3,54 \pm 0,06$).

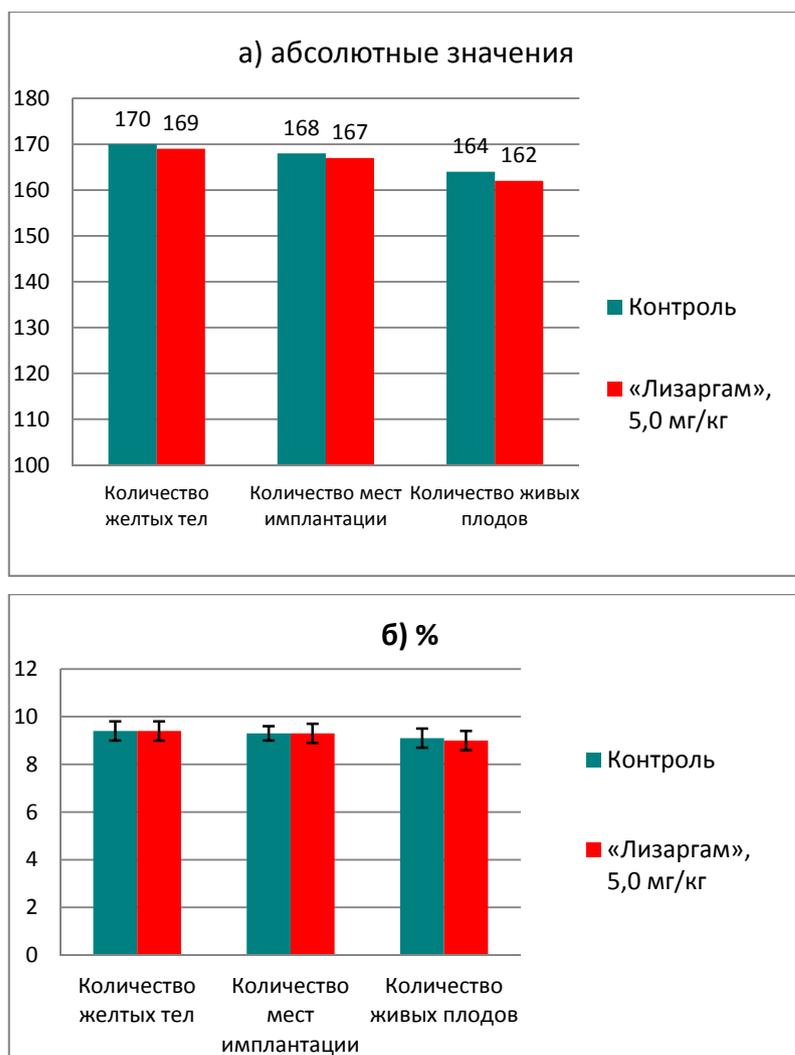


Рис. 1. Влияние препарата «Лизаргам» на параметры репродуктивной системы самок крыс

1.2. Изучение возможного эмбриотоксического действия

На первом этапе проводили оценку возможного действия препарата в пренатальный период развития. При и/н введении препарата самкам в дозах 1 и 5 мг/кг в течение 19 дней в репродуктивной системе самок не было обнаружено патологических изменений. Также не было выявлено нарушений в состоянии плодов.

На втором этапе изучали возможное постнатальное действие препарата. Результаты показали, что после введения препарата крысам не было обнаружено патологических изменений в развитии их потомства. Оценка количественных показателей, параметров физического развития, сроков формирования сенсорно-двигательных рефлексов и эмоционально-двигательного поведения неполовозрелого потомства самок крыс, получавших «Лизаргам», не выявила различий между контрольными и опытными группами (таблицы 1-3, рисунки 2, 3).

Количественные показатели потомства, рожденного от самок крыс, получавших препарат «Лизаргам»

Показатели	Группы животных M±m	
	Контроль	«Лизаргам», 5 мг/кг
Количество пометов, всего	15	15
Количество крысят, всего/в среднем в помете	145/ 9,7±0,3	144/ 9,6±0,3
В т.ч. живых, всего/в среднем в помете	140/ 9,3±0,2	140/ 9,3±0,4
Погибло в период вскармливания, всего/в среднем в помете	5/ 0,33±0,13	4/ 0,27±0,15
Самцов, всего	74	68
Самок, всего	66	72

Таблица 2

Показатели скорости созревания сенсорно-двигательных рефлексов неполовозрелого потомства самок крыс, получавших препарат «Лизаргам» (сутки)

Показатели	Группы животных M±m	
	Контроль	«Лизаргам», 5 мг/кг
Переворачивание на плоскости	7,11±0,07	7,14±0,06
Отрицательный геотаксис	6,31±0,07	6,32±0,07
Избегание обрыва	8,21±0,09	8,20±0,07

Таблица 3

Показатели исследования эмоционально-двигательного поведения неполовозрелого потомства самок крыс, получавших препарат «Лизаргам»

Показатели	Группы животных M±m	
	Контроль	«Лизаргам», 5 мг/кг
Время отсутствия активности, с	1,1±0,1	1,2±0,1
Число пересеченных секторов	34,2±0,7	34,8±0,6
Число вертикальных стоек	12,5±0,4	12,4±0,5
Заглядывания в отверстия	2,3±0,1	2,2±0,1
Акты урикации	1,4±0,1	1,3±0,1
Акты дефекации	1,1±0,1	1,2±0,1

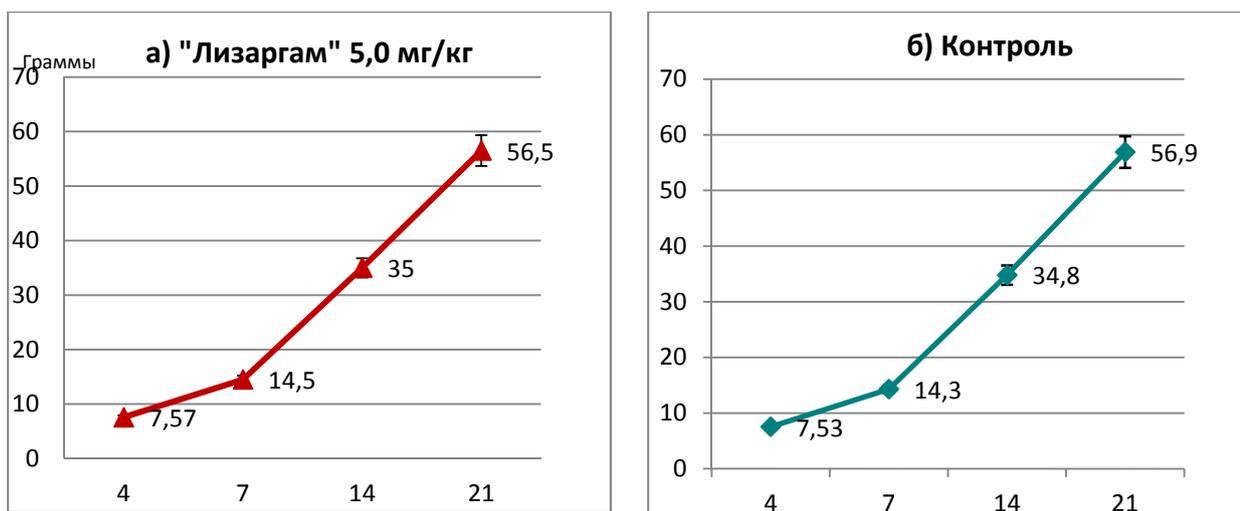


Рис. 2. Динамика прироста массы тела неполовозрелого потомства самок крыс, получавших препарат «Лизаргам» (граммы)

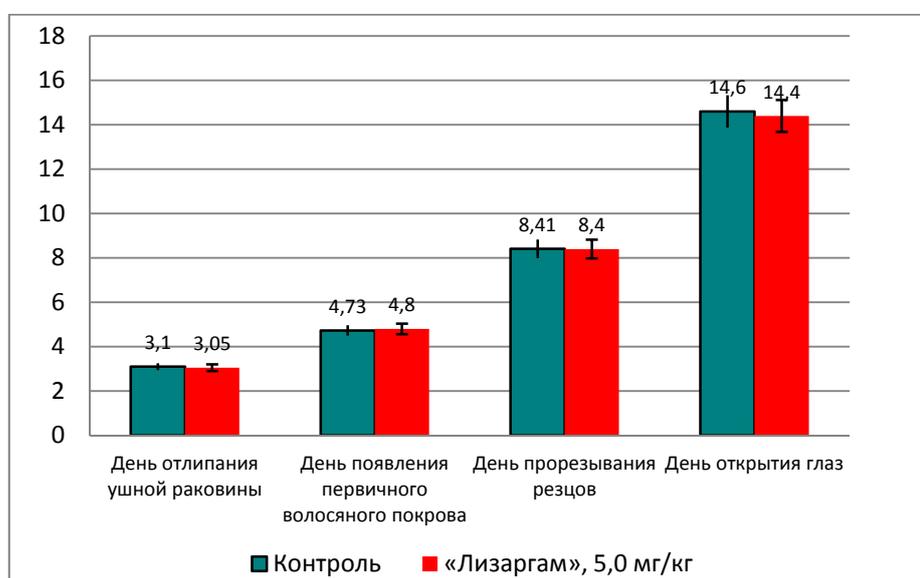


Рис. 3. Показатели физического развития неполовозрелого потомства самок крыс, получавших препарат «Лизаргам» (сутки)

2. Изучение возможной мутагенной активности препарата

2.1. Оценка мутагенной активности в тесте Эймса

В рамках данного исследования оценивали возможную мутагенную активность препарата по способности индуцировать генные мутации у бактерий *Salmonella typhimurium* линий TA98, TA 1537 и TA100. В качестве положительного контроля были использованы 2-амино- антрацен 10, 4NQO и 9-амино-акридин 10, при добавлении данных веществ число ревертантов достоверно увеличивалось. В то же самое время при внесении препарата «Лизаргам» в концентрациях 0,1-1000 мкг/чашку не наблюдали значительного увеличения количества ревертантов (таблица 4).

Оценка мутагенной активности препарата «Лизаргам» в тесте Эймса

Дозы препаратов, мкг/чашку	Среднее геометрическое число ревертантов на чашку					
	ТА 98		ТА 1537		ТА 100	
	НАМС	ПАМС	НАМС	ПАМС	НАМС	ПАМС
«Лизаргам»						
0.1	24.7	25.7	8.3	13.5	72.0	54.9
1.0	18.7	30.4	10.2	7.1	73.8	48.0
10.0	28.1	22.6	8.7	10.3	66.2	81.8
100.0	21.7	23.1	7.3	8.1	74.0	67.2
1000.0	22.9	22.9	8.9	8.6	71.9	62.1
Контроль	36.0	37.1	7.9	7.3	71.9	90.5
2-амино- антрацен 10		69.3		27.1		353.5
4NQO	1178.0				3952	
9-амино-акридин 10			7605			

2.2. Оценка по критерию хромосомных aberrаций в клетках красного костного мозга

Возможную мутагенную активность *in vivo* оценивали по уровню хромосомных aberrаций в клетках ККМ мышей (таблица 5). Как следует из данных таблицы 5, во всех группах встречаются 2 типа aberrаций (одиночные и парные фрагменты), а в группе животных, получавших циклофосфан, обнаружены также транслокации. Введение циклофосфана приводило к значительному увеличению числа хромосомных aberrаций. Частота aberrаций в группах мышей, получавших «Лизаргам», была сопоставима с таковой в группе негативного контроля и соответствует среднестатистическому спонтанному уровню aberrаций (1%), что является нормальным для мышей. Пятикратное введение препарата не вызывало значимого увеличения количества хромосомных aberrаций в клетках ККМ мышей.

Таблица 5

Изучение влияния препарата «Лизаргам» на уровень хромосомных aberrаций в клетках красного костного мозга

Дозы препаратов	Кол-во клеток	Кол-во клеток с aberrациями	Кол-во aberrаций	Типы aberrаций				% aberrантных клеток
				один. фрагм.	парн. фрагм.	дицентрические хромосомы	транслокации	
Контроль 1-кратно, самцы	500	5	5	-	5	-	-	1,0
Циклофосфан, самцы	500	203	208	200	6	-	2	40,6
«Лизаргам»,	500	7	8	5	3	-	-	1,4

6 мг/кг, 1-кратно, самцы								
«Лизаргам», 6 мг/кг, 5-кратно, самцы	500	6	7	3	4	-	-	1,2
«Лизаргам», 6 мг/кг, 5-кратно, самки	500	6	6	5	1	-	-	1,2
Контроль, 5-кратно, самцы	500	3	4	-	4	-	-	0,6
Контроль, 5-кратно, самки	500	5	5	3	2	-	-	1,0

2.3. Оценка уровня доминантных летальных мутаций

Уровни доминантных летальных мутаций в зародышевых клетках мыши оценивали по количеству постимплантационных потерь у самок. Полученные результаты свидетельствуют о том, что ни в одном случае уровень постимплантационных потерь не был статистически достоверно повышен ни в один из сроков наблюдения (таблица 6). Таким образом, введение препарата в исследуемой дозе не индуцировало доминантные летальные мутации ни на одной из стадий сперматогенеза.

Таблица 6

Влияние препарата «Лизаргам» на уровень доминантных летальных мутаций в зародышевых клетках мышей

Стадия сперматогенеза	Группы	Кол-во беременных самок	Фертильность, %	Постимплантационные потери	χ^2
Зрелые спермии	Контроль	26	87	0.04	
	«Лизаргам», 6 мг/кг	27	90	0.05	
Поздние сперматиды	Контроль	27	90	0.05	0.42
	«Лизаргам», 6 мг/кг	28	93	0.06	
Ранние сперматиды	Контроль	26	87	0.04	
	«Лизаргам», 6 мг/кг	27	90	0.06	

Заключение

Таким образом, результаты показали, что введение потенциального ЛС «Лизаргам» самцам и самкам крыс в течение гаметогенеза в дозе, в 250 раз превосходящей терапевтическую дозу для человека (5 мг/кг), не нарушало генеративную функцию самцов и самок. Также не выявлено негативного влияния на эмбриональное развитие потомства крыс, которым вводился «Лизаргам». Показано отсутствие достоверного воздействия препарата на пренатальное и постнатальное развитие потомства при введении его беременным самкам в

высоких дозах (до 5 мг/кг). Результаты тестов подтвердили, что «Лизаргам» не проявлял мутагенной активности. Препарат в концентрациях 0,1-1000 мкг/чашку не вызывал увеличения генных мутации у бактерий *Salmonella typhimurium* линий ТА98, ТА 1537 и ТА100. Не было выявлено увеличения уровня хромосомных aberrаций в клетках красного костного мозга у мышей после однократного или пятикратного введения препарата в дозе 6 мг/кг. Применение «Лизаргама» в исследуемой дозе (6 мг/кг) на разных стадиях сперматогенеза не индуцировало доминантные летальные мутации в зародышевых клетках мыши. Кроме того, поскольку у препарата отсутствуют эмбриотоксические и тератогенные свойства, можно заключить, что потенциальное ЛС «Лизаргам» является безопасным в плане возможного канцерогенного действия.

Конфликт интересов: конфликт интересов отсутствует.

Работа выполнена в ФГУП «Гос.НИИ ОЧБ» ФМБА России по Государственному контракту №14.Н08.11.0096 от 25 августа 2016 г.

Список литературы

1. Дейко Р.Д. Штрыголь С.Ю., Колобов А.А., Симбирцев А.С. Церебропротекторные свойства оригинальных пептидов, гомологичных первичной последовательности АКГ15-18 // Цитокины и воспаление. 2015. № 2. Т. 14. С. 27-30.
2. Колобов А.А., Смирнова М.П., Кампе-Немм Е.А., Шпень В.М., Вирцев А.А., Варюшина Е.А., Александров Г.В., Захаров М.С., Кирьянова А.С., Хуттунен О.Э., Румянцева А.Б., Митрофанов И.Д., Бендт И.В., Крылова А.Э., Чистякова А.Б. Доклинические исследования безопасности (острой и хронической токсичности) потенциального лекарственного средства на основе пептидэргического нейро- и стресс-протектора // Современные проблемы науки и образования. 2019. № 5. URL: <http://science-education.ru/ru/article/view?id=29201> (дата обращения: 07.10.2020). DOI: 10.17513/SPNO.29201.
3. Гуськова Т.А. Токсикология лекарственных средств. М.: «Русский врач», 2003. 154 с.
4. Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств. Под ред. А.Н. Миронова. Часть первая. М.: Гриф и К, 2012. 944 с.
5. ГОСТ 32378-2013. Методы испытания по воздействию химической продукции на организм человека. Испытания по оценке репродуктивной токсичности одного поколения. М: Стандартинформ. 2014. 13 с.
6. Методы испытания по воздействию химической продукции на организм человека.

Испытания по оценке репродуктивной/эмбриональной токсичности (скрининговый метод). М: Стандартиформ. 2014. 11 с.

7. ГОСТ 32380-2013. Методы испытания по воздействию химической продукции на организм человека. Испытания по оценке токсического воздействия на пренатальное развитие. М: Стандартиформ. 2019. 16 с.

8. ГОСТ Р 57130-2016. Лекарственные средства для медицинского применения. Исследование генотоксичности и интерпретация полученных данных. М: Стандартиформ. 2016. 24 с.