

ОПРЕДЕЛЕНИЕ МУТАГЕННОГО ПОТЕНЦИАЛА ПРОТИВОМИГРЕНОЗНОГО ЛЕКАРСТВЕННОГО ВЕЩЕСТВА РУ-31 В ВИДЕ СУБСТАНЦИИ И ГОТОВОЙ ЛЕКАРСТВЕННОЙ ФОРМЫ В ТЕСТАХ *IN VITRO* И *IN VIVO*

Аннотация. Исследованы генотоксические свойства противомигренозного лекарственного вещества РУ-31 в готовой лекарственной форме и фармакологической субстанции (ГЛФ и ФСРУ-31) на генные мутации в тесте *in vitro* с использованием микропланшетного теста Эймса, включающего тестерные штаммы *S. typhimurium* и *E. Coli*, и в тесте *in vivo* однократного и курсового введения на 60 белых беспородных крысах обоего пола с учетом хромосомных aberrаций в клетках костного мозга млекопитающих. Полученные в ходе проведения результаты свидетельствуют об отсутствии мутагенной активности противомигренозного лекарственного вещества.

Ключевые слова: *противомигренозное, мутагенный потенциал, тест Эймса, цитогенетика, белые крысы*

ORIGINAL ARTICLE

А. А. Spasov, G. L. Snigur, D. S. Yakovlev, S. S. Surin, D. A. Kavalerova, M. V. Postnova ✉

Volgograd State Medical University, Volgograd Russia

✉ postnova@volsu.ru

DETERMINATION OF THE MUTAGENIC POTENTIAL OF AN ANTI-MIGRAINE COMPOUND IN THE FINISHED DOSAGE FORM AND IN THE FORM OF CHEMICAL SUBSTANCE *IN VITRO* AND *IN VIVO* TESTS

Abstract. The genotoxic properties of the anti-migraine compound RU-31 in the finished dosage form and chemical substance (GLF and CS RU-31) for gene mutations in the *in vitro* test using the Ames microplate test, including test strains of *S. typhimurium* and *E. Coli*, and in the *in vivo* single test were studied and course administration on 60 white out breed rats, of both sexes, taking into account chromosomal aberrations in mammalian bone marrow cells. Obtained during the procedure indicate the absence of the mutagenic activity of the anti-migraine compound.

Keywords: *antimigrainous, mutagenic potential, ames test, cytogenetics, white rats*

Наиболее распространенной формой головной боли является мигрень, которой страдают около 15 % населения, для купирования ее приступов в настоящее время применяются препараты, частота эффективности которых не превышает 60–65 %. Актуальным является разработка и внедрение новых лекарственных препаратов, прошедших предварительный тестовый контроль на мутагенную активность, так как высокоэффективных профилактических средств этого заболевания на данный момент не существует. Исследование новых лекарственных средств, улучшающих мозговой кровоток при мигрени на генотоксичность является общепринятым и крайне важным этапом проверки по оценке безопасности для здоровья населения [1–3]. Определение генотоксичности

новых лекарственных средств является неотъемлемым этапом доклинических исследований.

В результате предварительных исследований было получено соединение, производное 2-метоксифенила-имидазобензимидазола (РУ-31) с 5-НТ_{2А}-антагонистическим механизмом действия, обладающее противомигренозными свойствами и на основе фармацевтической субстанции (ФС) РУ-31 получена твердая пероральная лекарственная форма – «РУ-31, таблетки по 8 мг» (готовая лекарственная форма, ГЛФ), способная устранять серотониновое влияние на сосуды головного мозга, требующая проведение доклинических испытаний на мутагенную активность в тестах *in vitro* и *in vivo*, чему, собственно, и посвящена настоящая работа [4, 5].

ЦЕЛЬ РАБОТЫ

Определить мутагенный потенциал противомигренозного лекарственного вещества, улучшающего мозговой кровоток с 5-HT₂-антагонистическим действием, производного 2-метоксифенил-имидазобензимидазола в виде фармацевтической субстанции и готовой лекарственной формы (ФС и ГЛФ РУ-31) в тестах *in vitro* и *in vivo*.

МЕТОДИКА ИССЛЕДОВАНИЯ

В исследовании использовали субстанцию РУ-31 (партия 006, лабораторный регламент 2/17 от 13.07.2017), синтезированную в ФГАО ВО Южный Федеральный университет, гранулят таблетированной лекарственной формы соединения РУ-31 (опытный образец 001 от 09.01.2018, лабораторный регламент № 01962942-005-2017 от 01.09.2017 г.), произведенный в Пятигорском медико-фармацевтическом институте – филиале ФГБОУ ВО ВолгГМУ Минздрава России.

Исследуя ФС РУ-31 на наличие генных мутаций в тесте *in vitro* (микропланшетный тест Эймса) [6], использовали набор Ames MPF™ Penta I (Хенометрикс, Швейцария), включавший тестерные штаммы *S. typhimurium* (TA98, TA100, TA1535 и TA1537) и *E. coli* (wp2 [pKM101] и wp2 *uvrA*) как рекомендованные Руководством по проведению доклинических исследований лекарственных средств. Индукция обратных мутаций по типу замены оснований на штаммах *S. typhimurium* происходила по паре GC, тогда как на штаммах *E. coli* – по паре AT, что позволяло детектировать мутагены, реализующие свой эффект путем окислительной модификации или за счет образования сшивок, а также мутагены гидразинового ряда. Набор штаммов бактерий, входящих в кит, соответствовал требованиям руководства по оценке химических соединений OECD 471.

Тестирование для получения истинного раствора проводили согласно условиям проведения исследования при изучении мутагенной активности. Образец (ФС РУ-31) изучали в 6 концентрациях (растворитель ДМСО непосредственно перед экспериментом) в разведениях 1 – 0,019531 мг/мл; 2 – 0,039063 мг/мл; 3 – 0,078125 мг/мл; 4 – 0,15625 мг/мл; 5 – 0,3125 мг/мл и 6 – 0,625 мг/мл; и позитивный контроль – мутаген согласно инструкции производителя набора; негативный контроль – растворитель (ДМСО) (Инструкция по применению Ames MPF™ Penta I тест Эймса в микропланшетном формате версия набора с полутвердыми стоками штаммов, Хенометрикс, Швейцария, Версия

4.5_S, 2012, 37 с.). Для статистической обработки данных каждая концентрация исследовалась в трех повторах методом t-test Стьюдента (одностронний, непарный). Различия считались достоверными при уровне значимости $p \leq 0,05$.

Этап исследования ГЛФ РУ-31 на индукцию хромосомных повреждений *in vivo* проводили с учетом хромосомных aberrаций в клетках костного мозга белых беспородных крыс в количестве 60 животных обоего пола (питомник ООО «НПК Биотех», Московская область). Животные содержались в стандартных условиях в соответствии с постановлением Главного государственного санитарного врача РФ от 29.08.2014 № 51 «Об утверждении СП 2.2.1.3218-14 «Санитарно-эпидемиологические требования к устройству, оборудованию и содержанию экспериментально-биологических клиник (вивариев)».

Цитогенетическое исследование проводили в двух сериях эксперимента, однократное и курсовое введение исследуемого препарата. Для изучения специфической фармакологической активности выбирались половозрелые крысы как рекомендованные Руководством по проведению доклинических исследований лекарственных средств и общепринятые для данного этапа доклинических исследований в количестве 60 штук, обоего пола. Количество животных, используемое в исследовании, было достаточным для полноценной оценки и интерпретации изучаемых эффектов и соответствовало рекомендациям, изложенным в Руководстве по проведению доклинических исследований лекарственных средств. В первой серии экспериментов тестируемый образец (ГЛФ РУ-31) растворяли в дистиллированной воде непосредственно перед экспериментом и вводили внутрижелудочно однократно 20 самцам крыс, по 5 животных в терапевтической 10 мг/кг и 1/10 от LD₅₀ – 93 мг/кг дозе. В качестве положительного контроля 5 самцам внутрибрюшинно вводили мутаген (циклофосфамид) в дозе 20 мг/кг. В качестве отрицательного контроля – 5 самцам внутрижелудочно вводили дистиллированную воду в объеме эквивалентном объему вводимой готовой лекарственной форме РУ-31. Во второй серии экспериментов сформировали 6 анализируемых групп для тестирования по 15 самцов и 15 самок белых беспородных крыс и вводили им внутрижелудочно в течение 5 суток в средней эффективной дозе по 10 мг/кг, ежедневно ГЛФ РУ-31. В качестве негативного контроля были использо-

ваны по 5 самцов и самок с внутрижелудочным введением дистиллированной воды в объеме эквивалентном объему вводимого ГЛФ РУ-31.

В качестве позитивного контроля были использованы 5 самцов и 5 самок, которым внутрибрюшинно вводили мутаген – циклофосфамид, пятикратно в дозировке 20 мг/кг. Эвтаназию проводили с помощью цервикальной дислокации у крыс, находящихся под хлоралгидратным наркозом, согласно правилам «Руководства по проведению доклинических исследований лекарственных средств» ее осуществляли своевременно, без причинения страданий, в помещении, где не содержались другие животные, по окончании срока эксперимента. Во всех группах от каждого животного анализировали 100 метафазных пластинок, с хорошим разбросом хромосом (модальное число хромосом 40) без наложений хромосом. Учитывали долю клеток, содержащих аберрантные хромосомы, отмечали наличие в клетках одиночных или парных фрагментов, обменов, гепов и множественных повреждений. Все данные обрабатывались методом описательной статистики с использованием подходящих критериев парного или множественного сравнения данных соответствующих Гауссовскому распределению данных. Статистический анализ проводился с использованием Microsoft Excel 2010 с расчетом базовых статистических показателей. Все исследования были одобрены Региональным исследовательским этическим комитетом Волгоградской области, протокол № 2032-2017 от 26.06.2017 г.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

В процессе изучения мутагенной активности ФС РУ-31 в тесте *in vitro* микропланшетном тесте Эймса, при анализе среднего числа позитивных лунок для *S. typhimurium* штаммов – TA98, TA100, TA1535 и TA1537 без активации и с активацией фракцией S9 увеличения числа ревертантных колоний по сравнению с негативным контролем выявлено не было. Кратность превышения числа ревертантов относительно нулевой линии была менее чем 2,0, что свидетельствовало об отсутствии мутагенного эффекта во всех изучаемых концентрациях для штаммов – TA98, TA100, TA1535, TA1537 без активации и с активацией фракцией S9. При анализе среднего числа позитивных лунок для комбинации штаммов *E. coli* (wp2 [pKM101] и *uvrA*) без активации и с активацией фракцией S9 увеличения числа ревертантных колоний по срав-

нению с негативным контролем выявлено не было. Кратность превышения числа ревертантов относительно нулевой линии была менее чем 2,0, что свидетельствовало об отсутствии мутагенного эффекта во всех изучаемых концентрациях для комбинации штаммов *E. coli* (wp2 [pKM101] и *uvrA*) без активации и с активацией фракцией S9.

Как следует из полученных данных, при однократном и при курсовом внутрижелудочном введении белым крысам в терапевтической дозе тестируемого образца (ГЛФ РУ-31) – 10 мг/кг и 1/10 от LD₅₀ (93 мг/кг) увеличения уровня клеток костного мозга, содержащих аберрации хромосом, не наблюдалось. В группе положительного контроля (циклофосфамид, 20 мг/кг, однократно и пятикратно, внутрибрюшинно) наблюдалось значительное возрастание доли клеток с аберрациями хромосом. Доля клеток с хромосомными аберрациями составила для самцов (27,8 ± 3,3) % при однократном введении и (28,4 ± 2,1) % при пятикратном введении, для самок – (26,8 ± 2,2) % при пятикратном введении. Таким образом, результаты, полученные при изучении мутагенной активности ФС РУ-31 в диапазоне концентраций 0,019531 мг/мл; 0,039063 мг/мл; 0,078125 мг/мл; 0,15625 мг/мл; 0,3125 мг/мл и 0,625 мг/мл в ходе проведения теста *in vitro* на индукцию генных мутаций (тест Эймса) на штаммах *S. typhimurium* TA98, TA100, TA1535, TA1537 и комбинации штаммов *E. coli* (wp2 [pKM101] и *uvrA*), свидетельствуют об отсутствии мутагенной активности. В условиях цитогенетического теста *in vivo* при внутрижелудочном введении белым беспородным крысам ГЛФ РУ-31 в изучаемых дозировках также не выявлено мутагенной активности.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В соответствии с проводимой в РФ политикой и международными требованиями в сфере обращения лекарственных средств, направленными на обеспечение населения эффективными и безопасными в первую очередь отечественными лекарственными средствами, созданными на основе достижений биологии, медицины и фармацевтических технологий, проведены доклинические исследования противомигренозного лекарственного средства, улучшающего мозговой кровоток с 5-HT₂-антагонистическим действием, производного 2-метоксифенил-имидазо-бензимидазола в виде фармацевтической субстанции и готовой лекарственной формы (ФС и ГЛФ РУ-31) в тестах *in vitro* и *in vivo* по определению их

мутагенного потенциала. Результаты исследований по безопасности к возможному риску применения для данного разрабатываемого лекарственного средства показали отсутствие мутагенной активности, что позволяет рекомендовать проведение дальнейшей разработки.

СПИСОК ИСТОЧНИКОВ

1. *Быков В. В.* Оценка мутагенности в тесте Эймса производного бензопентатиепина // Лабораторные животные для научных исследований. 2018. № 4. С. 2–14.
2. Морфофункциональные механизмы повреждения нейронов при ишемии головного мозга / Смирнов А. В., Горелик Е. В., Григорьева Н. В. [и др.] // Волгоградский научно-медицинский журнал. 2022. № 1. С. 5–10.
3. Современные направления разработки новых средств для лечения мигрени. Акцент на антагонисты 5-HT_{2A}-рецепторов / А. А. Спасов [и др.] // Биорганическая химия. 2019. Т. 45, № 3. С. 238–251.
4. Изучение кумулятивных свойств таблетированной формы нового противомигренозного средства РУ-31 / В. И. Корнилов [и др.] // Вестник Волгоградского государственного медицинского университета 2020. Вып. 4 (76). С. 46–49.
5. Нейрорецепторные эффекты антимигренозного агента 9-диэтиламиноэтил-2-(4-метоксифенил)имидазо[1,2-а] бензимидазола / Я. В. Агацарская [и др.] // Вестник Волгоградского государственного медицинского университета. 2019. Т. 69, № 1. С. 120–124.
6. *Dan D. Levy.* Recommended criteria for the evaluation of bacterial mutagenicity data (Ames test) // Mutation Research – Genetic Toxicology and Environ-

mental Mutagenesis. 2019. No. 848. Article 403074. doi:https://doi.org/10.1016/j.mrgentox.2019.07.004

REFERENCES

1. *Bykov V. V.* Evaluation of mutagenicity in the Ames test of a benzopentathiepine derivative. *Laboratornie jivotnie dlya nauchnih issledovanii = Laboratory animals for science.* 2018;(4):2–14. (in Russ.).
2. *Smirnov A. V., Gorelik E. V., Grigoryeva N. V. et al.* Morphofunctional mechanisms of neuronal damage in cerebral ischemia // *Volgograd Medical Scientific Journal = Volgogradskiy nauchno-medicinskiy jurnal.* 2022;1:5–10. (in Russ.).
3. *Spasov A. A. et al.* Current trends in the development of new drugs for the treatment of migraine. Emphasis on 5-HT_{2A} receptor antagonists. *Bioorganicheskaya himiya = Russian Journal of Bioorganic Chemistry.* 2019;45(3):238–251. (in Russ.).
4. *Kornilov V. I. et al.* Study of the cumulative properties of the tablet form of the new anti-migraine drug RU-31. *Vestnik Volgogradskogo gosudarstvennogo medicinskogo universiteta = Journal of Volgograd state medical university.* 2020;4 (76):46–49. (in Russ.).
5. *Agacarskaja Ja. V. et al.* Neuroreceptor effects of the antimigraine agent 9-diethylaminoethyl-2-(4-methoxyphenyl) imidazo[1,2-a] benzimidazole. *Vestnik Volgogradskogo gosudarstvennogo medicinskogo universiteta = Journal of Volgograd state medical university.* 2019;69(1):120–124. (in Russ.).
6. *Dan D. Levy.* Recommended criteria for the evaluation of bacterial mutagenicity data (Ames test). *Mutation Research – Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis.* 2019;848. Article 403074 // doi:https://doi.org/10.1016/j.mrgentox.2019.07.004

Информация об авторах

Александр Алексеевич Спасов – доктор медицинских наук, профессор, *pharmchair@mail.ru*

Григорий Леонидович Снигур – доктор медицинских наук, доцент, *glsnigur@volgmed.ru*

Дмитрий Сергеевич Яковлев – доктор медицинских наук, профессор, *pharmchair@mail.ru*

Святослав Сергеевич Сурин – ассистент, *svyatoslavsurin@gmail.com*

Дарья Алефтиновна Кавалерова – старший преподаватель, *dareznikova@yandex.ru*

Маргарита Викторовна Постнова – доктор биологических наук, старший научный сотрудник, *postnova@volsu.ru*, <https://orcid.org/0000-0001-6988-6389>

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Статья поступила в редакцию 16.04.2022; одобрена после рецензирования 30.04.2022; принята к публикации 12.05.2022.

Information about the authors

Alexander A. Spasov – Doctor of medical sciences, professor, *pharmchair@mail.ru*

Grigory L. Snigur – Doctor of medical sciences, associate professor *glsnigur@volgmed.ru*

Dmitry S. Yakovlev – Doctor of medical sciences, associate professor, *pharmchair@mail.ru*

Svyatoslav S. Surin – Assistant, *svyatoslavsurin@gmail.com*

Daria A. Kavalerova – Senior lecturer, *dareznikova@yandex.ru*

Margarita V. Postnova – Doctor of biological sciences, senior researcher, *postnova@volsu.ru*

The authors declare no conflicts of interests.

The article was submitted on 16.04.2022; approved after reviewing 30.04.2022; accepted for publication 12.05.2022.