

# МУТАГЕННЫЕ СВОЙСТВА ЛЕКАРСТВЕННОГО СРЕДСТВА НА ОСНОВЕ ТРИДЕКАПЕПТИДА В ТЕСТЕ ЭЙМСА И В ТЕСТЕ ПО УЧЕТУ МИКРОЯДЕР В ЭРИТРОЦИТАХ КРОВИ МЫШЕЙ

**А.Х. Шараф**

токсиколог, группа общей и специфических видов токсичности, Институт экспериментальной фармакологии (Санкт-Петербург)  
E-mail: sharaf.ah@doclinika.ru

**Е.Д. Бондарева**

руководитель группы биобезопасности, Институт экспериментальной фармакологии (Санкт-Петербург)

**К.Л. Крышень**

к.б.н., руководитель отдела токсикологии и микробиологии, Институт экспериментальной фармакологии (Санкт-Петербург)

**О.Н. Пожарицкая**

к.фарм.н., зам. директора по новым технологиям, Институт экспериментальной фармакологии (Санкт-Петербург)

**М.Н. Макарова**

д.м.н., зам. директора по науке, Институт экспериментальной фармакологии (Санкт-Петербург)

Изучена мутагенная активность лекарственного средства на основе тридекапептида H-Tyr-D-Arg-Phe-Gly-(D-Arg)8-Gly-OH\*10HCl в тесте по учету микроядер в эритроцитах крови мышей и в тесте Эймса. Установлено, что тестируемый объект в концентрациях 1000–0,01 мкг/мл не оказал мутагенного действия на штаммы *Salmonella typhimurium* TA98, TA100, TA1535, TA1537 при тестировании с метаболической активацией и без нее. Выявлено статистически значимое снижение количества колоний, вплоть до полного их отсутствия, при концентрации исследуемого вещества 1000 мкг/мл, что свидетельствует о цитотоксическом действии субстанции H-TYR-D-ARG-PHE-GLY-(D-ARG)8-GLY-OH\*10HCL *in vitro*. Установлено, что метаболическая активация резко снижает цитотоксические свойства тестируемой субстанции (в варианте теста с метаболической активацией цитотоксические свойства проявляются только на штамме TA98). Высказано предположение, что тестируемый объект подвергается метаболизму в ткани печени, что требует дополнительного изучения. В тесте по учету микроядер показано отсутствие мутагенного эффекта субстанции тридекапептида в дозах 1 и 10 мг/кг при однократном и семидневном внутрижелудочном введении.

**Ключевые слова:** мутагенность, анальгетик, тридекапептид, генотоксичность, микроядра, тест Эймса, цитотоксичность.

**Для цитирования:** Шараф А.Х., Бондарева Е.Д., Крышень К.Л., Пожарицкая О.Н., Макарова М.Н. Мутагенные свойства лекарственного средства на основе тридекапептида в тесте Эймса и в тесте по учету микроядер в эритроцитах крови мышей. Вопросы биологической, медицинской и фармацевтической химии. 2018; 21(8): 38–44. <https://doi.org/10.29296/25877313-2018-08-06>

В настоящее время пептидные лекарственные препараты получают все большую популярность и значение. Эксперты ожидают, что к 2018 г. мировой рынок пептидных препаратов будет составлять не менее 18 млрд долларов.

Препараты пептидной структуры появились в фармакологии относительно давно, еще в донаучный период ее развития. Речь идет не о научной и доказательной фармакологии, а эмпирическом использовании различных вытяжек из органов животных, которые использовались, как правило, бездоказательно и часто с шарлатанскими целями. Несмотря на кажущуюся архаичность лечения подобными препаратами, в настоящее время убедительно доказано, что многие из них содержат активные действующие вещества, например, сердце – пептид кардиалин, мозг – активные нейропептиды, кожа

амфибий – пептид бомбезин. Сформирован перспективный подход использования тканей животных и человека для создания так называемых органо-препаратов. До настоящего времени такие препараты производятся и весьма популярны [1].

С открытием пептидных гормонов гипофиза, инсулина, глюкагона, гипоталамических рилинг-гормонов (либеринов и статинов), а также доказательством регуляторной функции пептидов был дан толчок к развитию пептидной химии, и на основе структурного сходства с естественными (природными) пептидами и по аналогии с ними стали синтезировать короткомерные олигопептиды, обладающие высокой фармакологической активностью [1].

Сравнительный анализ показывает, что функция большинства регуляторных пептидов реализо-

вана с участием центральной нервной системы. Отмечается преимущественное участие в регуляции центральных процессов опиоидных пептидов (орфанинов, энкефалинов, динорфинов), нейропептида Y, мозгового натрий-уретического пептида, вещества P и сравнительно новых пептидов – орексинов A и B. В связи с этим разработка новых высокоэффективных лекарственных средств на основе регуляторных пептидов является актуальной задачей. В настоящее время активно ведется создание синтетических аналогов эндогенных регуляторных пептидов, обладающих заданным спектром рецепторного действия и лишенных недостатков, присутствующих энкефалинам и эндорфинам: плохой проницаемостью через гематоэнцефалический барьер (ГЭБ) и высокой скоростью биодegradации [2].

Объектом проведенного исследования является кандидат в лекарственное средство в форме таблеток для перорального применения, содержащее в качестве активной фармацевтической субстанции тридекапептид H-Tyr-D-Arg-Phe-Gly-(D-Arg)<sub>8</sub>-Gly-OH\*10HCl.

Тридекапептид представляет собой соединение тетрапептида (Tyr-D-Arg-Phe-Gly-NH<sub>2</sub>) и олигоаргининового вектора. D-формы полиаргинина, будучи высокостабильными, низкотоксичными молекулами, являются ингибиторами фурина, протеолитического фермента, относящегося к сериновым протеазам клеток млекопитающих, расположенных в аппарате Гольджи [3]. Соответственно, включение полиаргининового вектора в структуру пептидной молекулы могло бы препятствовать действию эндопептидаз и способствовать увеличению продолжительности действия пептида. Кроме того, для октоаргининовых пептидов установлена способность проникать внутрь клетки через мембрану при помощи различных молекулярных механизмов и увеличивать проницаемость ГЭБ [4, 5]. Проведенное пилотное исследование показало, что введение октоаргининового фрагмента в структуру тетрапептидной молекулы позволяет увеличить устойчивость пептида к протеолитическим ферментам желудочно-кишечного тракта, создавая перспективу для перорального применения лекарственного кандидата.

Обязательной частью программы доклинических испытаний новых фармакологических средств является исследование мутагенности, которое предусматривает оценку их способности к индукции разных типов мутаций в зародышевых и соматических клетках животных, клетках микро-

организмов. Такие исследования необходимы как для определения возможных побочных эффектов потенциального лекарственного препарата, так и для определения возможных рисков при будущем его производстве. Для этого используют комплекс методов, выполняемых на разных объектах, в том числе тест на индукцию генных мутаций (тест Эймса), предназначенный для быстрого тестирования и определения мутагенного эффекта соединений, и тест на индукцию хромосомных повреждений *in vivo* (учет микроядер в периферической крови млекопитающих) [6–8].

Цель исследования – изучение мутагенных свойств лекарственного средства на основе тридекапептида H-Tyr-D-Arg-Phe-Gly-(D-Arg)<sub>8</sub>-Gly-OH\*10HCl в тесте Эймса и в тесте по учету микроядер в периферической крови мышей (микроядерный тест).

## МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

**Тест Эймса.** Для проведения исследования мутагенности в тесте Эймса использовали набор Ames MPF 98/100/1535/1537 («Xenometrix», Швейцария), содержащий в своем составе все необходимые реагенты, в том числе штаммы микроорганизмов и позитивные контроли. Эксперимент был проведен в полном соответствии с инструкцией к набору [9].

Тестируемым объектом служила субстанция тридекапептида H-Tyr-D-Arg-Phe-Gly-(D-Arg)<sub>8</sub>-Gly-OH\*10HCl (ЗАО «Институт экспериментальной фармакологии», серия 220816, Россия). В качестве индикаторных микроорганизмов в соответствии с рекомендациями OECD № 471 были использованы штаммы *Salmonella typhimurium* TA98, TA100, TA1535, TA1537, имеющие мутации, ведущие к нарушению синтеза гистидина и неспособности бактерий к росту на среде, не содержащей гистидин [10, 11]. Наличие мутаций позволяет регистрировать действия мутагенов, вызывающих мутации замены пар оснований (TA100, TA1535) или сдвиг рамки считывания (TA98, TA1537) [12–14].

Исследование было проведено в варианте с метаболической активацией постмитохондриальной фракцией гомогената печени крыс S9 (входит в состав набора Ames MPF) и без метаболической активации [13, 14].

**Микроядерный тест.** Тест по учету микроядер заключается в оценке количества микроядер в полихроматофильных (ПХЭ) и нормохроматофильных эритроцитах (НХЭ) периферической

крови мышей после курсового введения тестируемых объектов [6, 7, 10]. В работе были использованы аутбредные мыши (36 самцов и 36 самок возрастом 9–11 недель, массой 30–35 г). Животных содержали в стандартных условиях (в соответствии с Европейской директивой 2010/63) [15].

Данное исследование было рассмотрено на биоэтической комиссии и одобрено для проведения (№ БЭК 4.65/16 от 23 декабря 2016 г.). Тестируемый объект вводили внутривенно в дозах 1 мг/кг (предполагаемая терапевтическая доза при перерасчете на мышей с учетом межвидовых коэффициентов перерасчета доз) и 10 мг/кг самцам и самкам аутбредных мышей (в каждой группе по 6 самцов и 6 самок) однократно и ежедневно на протяжении 7 дней, что соответствует планируемому курсу клинического применения. Препарат вводили в виде суспензии в 1%-ном растворе крахмала. В качестве позитивного контроля использовали субстанцию циклофосфамида моногидрат (CAS-number 6055-19-2, «Sigma Aldrich», США) при однократном внутривенном введении в дозе 50 мг/кг. Через 24 ч после последнего введения исследуемых объектов проводили эвтаназию животных в CO<sub>2</sub>-камере (в соответствии с Европейской директивой 2010/63) и забор периферической крови. [15].

Для оценки микроядер подготавливали мазки крови и окрашивали ДНК-специфическим красителем акридиновым оранжевым по методу Hayashi et al. [16, 17]. Проводили подсчет ПХЭ, НХЭ с микроядром и соотношение ПХЭ/НХЭ визуально с использованием флуоресцентного микроскопа (Axio Scope A1, «Carl Zeiss», Германия).

Были подсчитаны среднее значение и стандартная ошибка среднего полученных данных. Для статистической обработки данных использовали однофакторный дисперсионный анализ (ANOVA) с последующим межгрупповым сравнением (post hoc) с применением теста Тьюки (post hoc Tukey). Различия были определены при 0,05 уровне значимости.

Статистический анализ выполняли с помощью программного обеспечения Statistica 10.0 («StatSoft», США).

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

**Результаты теста Эймса.** По результатам проведенного теста Эймса тестируемый объект не

индуцировал мутации по типу сдвига рамки считывания (штаммы TA98 и TA1537) и замены пар оснований (штаммы TA100, TA1535) в диапазоне тестируемых концентраций. Количество позитивных лунок в данных концентрациях не превышало уровень базовой линии более чем в 2 раза, что свидетельствует об отсутствии мутагенного эффекта. Однако анализ данных с использованием критерия Стьюдента выявил статистически значимое снижение количества колоний, вплоть до полного отсутствия колоний в концентрации 1000 мкг/мл, что свидетельствует о цитотоксическом действии субстанции H-TYR-D-ARG-PHE-GLY-(D-ARG)8-GLY-OH\*10HCL *in vitro*.

Результаты тестирования без активации системы микросомальной фракцией S9 представлены в табл. 1.

Метаболическая активация фракцией S9 печени крыс не повлияла на уровень мутагенной активности тестируемого объекта. В диапазоне тестируемых концентраций не было выявлено мутаций по типу сдвига рамки считывания (штаммы TA98 и TA1537) и замены пар оснований (штаммы TA100, TA1535). Однако анализ данных с использованием критерия Стьюдента выявил статистически значимые различия между тестируемой субстанцией в концентрациях 1000 и 100 мкг/мл и культуральной средой (уровень нулевой линии), что свидетельствует о цитотоксическом действии тестируемого объекта. Результаты тестирования с активацией системы микросомальной фракцией S9 представлены в табл. 2.

Как видно по результатам теста Эймса, метаболическая активация резко снижает цитотоксические свойства тестируемой субстанции (в варианте теста с метаболической активацией цитотоксические свойства проявляются только на штамме TA98). Это позволяет предположить, что тестируемый объект подвергается метаболизму в ткани печени, что требует дополнительного изучения.

**Результаты микрояденого теста.** Результаты теста по учету микроядер в эритроцитах периферической крови мышей представлены в табл. 3.

В группах негативного контроля показатели частоты НХЭ и ПХЭ крови с микроядрами находились в пределах нормальных значений (1–2 %) [5, 8].

**Таблица 1. Количество ревертантных колоний при тестировании субстанции тридекапептида без активации S9 ( $M \pm SD$ ),  $n=48$**

Субстанция	Доза, мкг/мл	Штаммы			
		TA98	TA100	TA1535	TA1537
H-TYR-D-ARG-PHE-GLY-(D-ARG)8-GLY-OH*10HCL	1000	0,33 ± 0,58*	0,00 ± 0,00*	0,00 ± 0,00*	0,33 ± 0,58*
	100	0,33 ± 0,58*	1,00 ± 1,00*	0,33 ± 0,58*	0,00 ± 0,00*
	10	2,00 ± 2,65	5,33 ± 3,06	1,33 ± 0,58	1,00 ± 1,73
	1	2,67 ± 1,53	8,33 ± 2,08	2,33 ± 1,53	1,33 ± 1,53
	0,1	4,00 ± 1,73	7,67 ± 1,53	2,67 ± 1,53	2,67 ± 1,53
	0,01	4,33 ± 2,31	8,33 ± 1,15	3,00 ± 1,73	1,00 ± 1,00
Негативный контроль	0	2,67 ± 1,53	8,67 ± 0,58	3,00 ± 2,00	3,33 ± 2,08
Базовая линия негативного контроля	–	4,19	9,24	5,00	5,41
2-нитрофлуорен	2,0	41,33 ± 0,58	–	–	–
N-оксид-4-нитрохинолин	0,1	–	48,00 ± 0,00	–	–
N4-аминоцитидин	100	–	–	26,67 ± 0,58	–
9-аминоакридин	15	–	–	–	41,67 ± 0,58

Примечание: \* – статистически значимо отличается от негативного контроля (культуральная среда) по *t*-критерию Стьюдента ( $p < 0,05$ ).

**Таблица 2. Количество ревертантных колоний при тестировании субстанции тридекапептида в присутствии S9 ( $M \pm SD$ ),  $n=48$**

Субстанция	Доза, мкг/мл	Штаммы			
		TA98	TA100	TA1535	TA1537
H-TYR-D-ARG-PHE-GLY-(D-ARG)8-GLY-OH*10HCL	1000	0,33 ± 0,58*	8,67 ± 2,89	1,67 ± 1,15	1,33 ± 1,15
	100	0,33 ± 0,58*	7,67 ± 0,58	1,67 ± 0,58	1,33 ± 1,53
	10	2,33 ± 1,53	10,33 ± 5,03	1,33 ± 1,53	3,00 ± 2,65
	1	1,67 ± 0,58	6,00 ± 4,00	2,33 ± 0,58	2,00 ± 2,65
	0,1	3,67 ± 1,53	8,33 ± 2,31	2,00 ± 1,73	2,67 ± 1,53
	0,01	3,33 ± 0,58	5,67 ± 1,53	2,33 ± 3,21	2,00 ± 2,65
Негативный контроль	0	3,33 ± 1,53	6,67 ± 4,93	1,33 ± 0,58	2,00 ± 1,00
Базовая линия негативного контроля	–	4,86	11,60	1,91	3,00
2-аминоантрацен	5,0	41,0 ± 1,00	48,00 ± 0,00	47,67 ± 0,58	46,00 ± 1,00

Примечание: см. табл. 1.

**Таблица 3. Результаты учета микроядер в эритроцитах периферической крови самцов и самок мышей после однократного и курсового введения тестируемых объектов ( $M \pm m$ ),  $n=10$**

Препарат	Доза, мг/кг	Пол	% ПХЭ/НХЭ	о/оо НХЭ с микроядром	о/оо ПХЭ с микроядром
Лекарственное средство на основе H-Tyr-DArg-Phe-Gly-(D-Arg)8-Gly-OH*10HCl (однократное введение)	1	самцы	1,9 ± 0,23	2,0 ± 0,27	1,8 ± 0,32
		самки	1,7 ± 0,11	2,7 ± 0,40	1,6 ± 0,39
	10	самцы	1,6 ± 0,06	1,5 ± 0,15	1,3 ± 0,17
		самки	1,9 ± 0,14	1,5 ± 0,26	1,6 ± 0,32
Лекарственное средство на основе H-Tyr-DArg-Phe-Gly-(D-Arg)8-Gly-OH*10HCl (курсовое введение 7 дней)	1	самцы	2,0 ± 0,07	1,8 ± 0,16	2,1 ± 0,28
		самки	2,3 ± 0,08	1,4 ± 0,58	2,2 ± 0,63
	10	самцы	2,0 ± 0,26	1,3 ± 0,29	1,8 ± 0,38
		самки	2,3 ± 0,18	2,0 ± 0,30	2,2 ± 0,31
Циклофосфамид (позитивный контроль)	50	самцы	8,2 ± 0,37*	8,1 ± 0,72*	8,9 ± 0,53*
		самки	8,2 ± 0,49*	8,0 ± 0,75*	8,6 ± 0,62*
1% раствор крахмала (негативный контроль)	–	самцы	1,4 ± 0,10	2,2 ± 0,35	1,7 ± 0,28
		самки	1,5 ± 0,10	2,6 ± 0,43	2,3 ± 0,39

Примечание: \* – различия статистически значимы по сравнению с группами животных негативного контроля, ANOVA, критерий Тьюки,  $p < 0,05$ .

Межгрупповой анализ данных с использованием критерия Тьюки выявил статистически значимое увеличение показателей ПХЭ с микроядром, НХЭ с микроядром, а также процентное соотношение ПХЭ/НХЭ в группе животных, получивших однократно внутривенно циклофосфамид в дозе 50 мг/кг относительно групп негативного контроля (табл. 3).

Статистически значимых отличий между группами мышей, получившими тестируемый объект в исследуемых дозах внутрижелудочно, и группой негативного контроля выявлено не было. Полученные значения в группах, получавших тестируемый объект, не превышали нормальные [6]. Лекарственное средство на основе Н-Туг-DArg-Phe-Gly-(D-Arg)8-Gly-OH\*10HCl в исследуемых дозах не увеличивало количество микроядер в ПХЭ и НХЭ и не влияло на процентное соотношение ПХЭ/НХЭ ( $p > 0,05$ ).

Согласно V. Thybaud et al., с научной точки зрения нет причин тестировать на предмет мутагенных свойств пептиды, содержащие только натуральные аминокислоты. Однако в случае ввода в молекулу ненатуральных аминокислот, органических линкеров и других соединений рекомендуется изучение мутагенных свойств [18].

S. Castellino et al. в своей работе также отмечают, что синтетические пептиды не проявляют мутагенных свойств, тем не менее один из представителей этой группы соединений, эледоизин, показал мутагенные свойства в тесте Эймса на штамме TA1525. Авторы связывают этот факт со следовыми количествами солей азидов, содержащихся в препарате [19]. Также ложноположительные результаты в тесте Эймса могут быть следствием воздействия образовавшихся в результате разложения пептидов аминокислот гистидина и/или триптофана [18].

## ВЫВОДЫ

1. В результате проведенного исследования было установлено, что субстанция тридекапептида не оказала генотоксического действия в тесте Эймса на бактериальных штаммах *Salmonella typhimurium* TA98, TA100, TA1535, TA1537 и в тесте по учету микроядер в эритроцитах крови мышей.
2. Полученные данные позволяют рекомендовать тридекапептид в качестве безопасного сырья для создания лекарственных препаратов на его основе.

Данная научно-исследовательская работа была выполнена в рамках государственного контракта №14.N08.12.1039.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Шабанов П.Д. Фармакология лекарственных препаратов пептидной структуры // Психофармакология и биологическая наркология. 2008. Т. 8. С. 2399–2425.
2. Соловьев В.Б. Нейропептиды: структурно-функциональная классификация // Actualscience. 2015. № 4. С. 22–35.
3. Kasprzak M.M., Peinado J.R., Than M.E., Appel J., Henrich S., Lipkind G., Houghten R.A., Bode W., Lindberg I. Inhibition of furin by polyarginine-containing peptides: nanomolar inhibition by nona-D-arginine // J Biol Chem. 2004. V. 279. № 35. P. 36788–36794.
4. Khen Eng Ng, Mohd Cairul Iqbal Mohd Amin, corresponding author Haliza Katas, Muhammad Wahab Amjad, Adeel Masood Butt, Prashant Kesharwani, and Arun K. Iyer. pH-Responsive Triblock copolymeric micelles decorated with a cell-penetrating peptide provide efficient doxorubicin delivery // Nanoscale Res. Lett. 2016. № 11. P. 539.
5. Yoneda A., Couchman J.R. Regulation of cytoskeletal organization by syndecan transmembrane proteoglycans // Matrix Biol. 2003. V. 22. № 1. P. 25–33.
6. Миронов А.Н. Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств. Ч. 1. М.: Гриф и К. 2012.
7. OECD (2014), Test No. 474: Mammalian Erythrocyte Micronucleus Test. OECD Publishing. Paris; doi: 10.1787/9789264224292-en.
8. International Conference on Harmonisation; guidance on S2(R1) Genotoxicity Testing and Data Interpretation for Pharmaceuticals intended for Human Use; availability // Notice. Fed. Regist. 2012. V. 77. № 110. P. 33748–33749.
9. Описание набора Ames MPF 98/100/1535/1537 [Электронный ресурс]. Режим доступа: <http://www.xenometrix.ch/en/products/details/ames-mpf-and-ames-ii-mutagenicity-assay-systems.html>.
10. Ames B.N., Mc. Cann J., Vamasaki E. Methods for detection carcinogens and mutagens with *Salmonella/mammalian* microsome mutagenicity test // Mutat. Res. 1975. V. 31. № 6. P. 347–364; doi: 10.1016/0165-1161(75)90046-1.
11. Ацапкина А.А., Крышень К.Л., Макарова М.Н., Макаров В.Г. Применение бактериальных тест-систем для оценки потенциального мутагенного эффекта новых фармацевтических соединений // Международный вестник ветеринарии. 2014. № 2. С. 109–113.
12. Barnes W., Tuley E., Eisenstadt E. Base-sequence analysis of His<sup>+</sup> revertants of the hisG46 missense mutation in *Salmonella typhimurium* // Environ. Mutagen. 1982. V. 4. № 3. P. 297–297.
13. Ames B.N., Lee F.D., Durston W.E. An improved bacterial test system for the detection and classification of mutagens and carcinogens // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1973. № 70. P. 782–786.
14. Белицкий Г.А., Худoley В.В. Краткосрочные тесты в системе выявления канцерогенных для человека химических соединений // Вопросы онкологии. 1998. Т. 32. № 4. С. 1–3.

15. Директива 2010/63/EU Европейского парламента и Совета Европейского Союза от 22.09.2010 г. по охране животных, используемых в научных целях.
16. Hayashi M., Morita T., Kodama Y., Sofuni T., Ishidate M. (Jr.) The micronucleus assay with mouse peripheral blood reticulocytes using acridine orange-coated slides // *Mutat. Res.* 1990. V. 245. № 4. P. 245–249.
17. Oliveira-Martins C.R., Grisolia C.K. Determination of micronucleus frequency by acridine orange fluorescent staining in peripheral blood reticulocytes of mice treated topically with different lubricant oils and cyclophosphamide // *Genetics and Molecular Research.* 2007. V. 6. № 3. P. 566–574.
18. Thybaud V., Kasper P., Sobol Zh., Elhajouji A., Fellows M., Guerard M., Lynch A.M., Sutter A. and Tanir J.Y. Genotoxicity assessment of peptide/protein-related biotherapeutics: points to consider before testing // *Mutagenesis.* 2016. № 31. P. 375–384.
19. Castellino S., de Castiglione R., Forino R., Galantino M. and Pulci R. Mutagenic contaminants in synthetic peptides obtained by an azide coupling // *Mutagenesis.* 1991. V. 6. № 3. P. 185–187.

Поступила 15 мая 2018 г.

## THE MUTAGENIC PROPERTIES OF THE DRUG BASED ON THE TRIDECAPEPTIDE IN THE AMES TEST AND IN THE MOUSE BLOOD ERYTHROCYTE MICRONUCLEUS TEST

© Authors, 2018

**A.H. Sharaf**

Toxicologist, the Group of General and Specific Types of Toxicity, Institute of Experimental Pharmacology (Saint-Petersburg)  
E-mail: sharaf.ah@doclinika.ru

**E.D. Bondareva**

Head of the Biosafety Group, Institute of Experimental Pharmacology (Saint-Petersburg)

**K.L. Kryshen**

Ph.D.(Biol.), Head of the Department of Toxicology and Microbiology, Institute of Experimental Pharmacology (Saint-Petersburg)

**O.N. Pozharitskaja**

Ph.D.(Pharm.), Deputy Director for New Technologies, Institute of Experimental Pharmacology (Saint-Petersburg)

**M.N. Makarova**

Dr.Sc. (Med.), Deputy Director for Science, Institute of Experimental Pharmacology (Saint-Petersburg)

The mutagenic activity of the drug based on the tridecapeptide H-Tyr-D-Arg-Phe-Gly-(D-Arg)<sub>8</sub>-Gly-OH \* 10HCl was studied. The tridecapeptide is a combination of the tetrapeptide (Tyr-D-Arg-Phe-Gly-NH<sub>2</sub>) and an oligoarginine vector. The introduction of the octoarginine fragment into the structure of the tetrapeptide molecule makes it possible to increase the resistance of the peptide to proteolytic enzymes of the gastrointestinal tract, creating a perspective of the oral administration of the drug candidate. In addition, for the octoarginine peptides, the ability to penetrate the cell through the membrane through various molecular mechanisms and to increase the permeability of the blood-brain barrier (BBB) has been established. Mutagenic properties have been studied in the mouse blood erythrocyte micronucleus test and in the Ames test.

In the Ames test, it was found that the test object at concentrations of 1000–0.01 µg/ml had no mutagenic effect on the *Salmonella typhimurium* strains TA98, TA100, TA1535, TA1537 when tested with and without metabolic activation. However, a statistically significant decrease in the number of colonies was revealed, up to their complete absence at the concentration of the investigated substance of 1000 µg/ml, which indicates the cytotoxic effect of the substance H-TYR-D-ARG-PHE-GLY-(D-ARG)<sub>8</sub>-GLY-OH \* 10HCL, which could not be detected in a screening study. A metabolic activation sharply reduces the cytotoxic properties of the test substance (in a variant of the test with metabolic activation, cytotoxic properties appear only on strain TA98). This suggests that the test object is subjected to metabolism in the liver tissue, which requires further study.

The micronucleus test shows the absence of a mutagenic effect of the tridecapeptide substance in doses of 1 mg/kg and 10 mg/kg for single and seven-day intragastric administration.

**Key words:** *mutagenicity, analgesic, tridecapeptide, oligoarginine vector, genotoxicity, micronucleus test, Ames test, cytotoxicity.*

**For citation:** Sharaf A.H., Bondareva E.D., Kryshen K.L., Pozharitskaja O.N., Makarova M.N. The mutagenic properties of the drug based on the tridecapeptide in the ames test and in the mouse blood erythrocyte micronucleus test. *Problems of biological, medical and pharmaceutical chemistry.* 2018;21(8):38–44. <https://doi.org/10.29296/25877313-2018-08-06>

### REFERENCES

1. Shabanov P.D. Farmakologiya lekarstvennyh preparatov peptidnoj struktury // *Psihofarmakologiya i biologicheskaya narkologiya.* 2008. T. 8. S. 2399–2425.
2. Solov'ev V.B. Nejropeptidy: strukturno-funkcional'naya klassifikaciya // *Actualscience.* 2015. № 4. S. 22–35.

3. Kacprzak M.M., Peinado J.R., Than M.E., Appel J., Henrich S., Lipkind G., Houghten R.A., Bode W., Lindberg I. Inhibition of furin by polyarginine-containing peptides: nanomolar inhibition by nona-D-arginine // J Biol Chem. 2004. V. 279. № 35. P. 36788–36794.
4. Khen Eng Ng, Mohd Cairul Iqbal Mohd Amin, corresponding author Haliza Katas, Muhammad Wahab Amjad, Adeel Masood Butt, Prashant Kesharwani, and Arun K. Iyer. pH-Responsive Triblock Copolymeric Micelles Decorated with a Cell-Penetrating Peptide Provide Efficient Doxorubicin Delivery // Nanoscale Res. Lett. 2016. № 11. P. 539.
5. Yoneda A., Couchman J.R. Regulation of cytoskeletal organization by syndecan transmembrane proteoglycans // Matrix Biol. 2003. V. 22. № 1. P. 25–33.
6. Mironov A.N. Rukovodstvo po provedeniyu doklinicheskikh issledovanij lekarstvennykh sredstv. CH. 1. M.: Grif i K. 2012.
7. OECD (2014), Test No. 474: Mammalian Erythrocyte Micronucleus Test. OECD Publishing, Paris. doi: 10.1787/9789264224292-en.
8. International Conference on Harmonisation; guidance on S2(R1) Genotoxicity Testing and Data Interpretation for Pharmaceuticals intended for Human Use; availability // Notice. Fed. Regist. 2012. V. 77. № 110. P. 33748–33749.
9. Opisaniye nabora Ames MPF 98/100/1535/1537 [EHlektronnyj resurs]. Rezhim dostupa: <http://www.xenometrix.ch/en/products/details/ames-mpf-and-ames-ii-mutagenicity-assay-systems.html>.
10. Ames B.N., Mc. Cann J., Vamasaki E. Methods for detection carcinogens and mutagens with Salmonella/mammalian microsome mutagenicity test // Mutat. Res. 1975. V. 31. № 6. P. 347–364. doi: 10.1016/0165-1161(75)90046-1.
11. Acapkina A.A., Kryshen' K.L., Makarova M.N., Makarov V.G. Primeneniye bakterial'nykh test-sistem dlya ocenki potencial'nogo mutagenogo ehffekta novykh farmaceuticheskikh soedinenij // Mezhdunarodnyj vestnik veterinarii. 2014. № 2. S. 109–113.
12. Barnes W., Tuley E., Eisenstadt E. Base-sequence analysis of His<sup>+</sup> revertants of the hisG46 missense mutation in Salmonella typhimurium // Environ. Mutagen. 1982. V. 4. № 3. P. 297–297.
13. Ames B.N., Lee F.D., Durston W.E. An improved bacterial test system for the detection and classification of mutagens and carcinogens // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1973. № 70. P. 782–786.
14. Belickij G.A., Hudoley V.V. Kratkosrochnye testy v sisteme vyavleniya kancerogennykh dlya cheloveka himicheskikh soedinenij // Voprosy onkologii. 1998. T. 32. № 4. S. 1–3.
15. Direktiva 2010/63/EU Evropejskogo parlamenta i Soveta Evropejskogo Soyuzha ot 22.09.2010 g. po ohrane zhivotnykh, ispol'zuemykh v nauchnykh celyah.
16. Hayashi M., Morita T., Kodama Y., Sofuni T., Ishidate M. (Jr.) The micronucleus assay with mouse peripheral blood reticulocytes using acridine orange-coated slides // Mutat. Res. 1990. V. 245. № 4. P. 245–249.
17. Oliveira-Martins C.R., Grisolia C.K. Determination of micronucleus frequency by acridine orange fluorescent staining in peripheral blood reticulocytes of mice treated topically with different lubricant oils and cyclophosphamide // Genetics and Molecular Research. 2007. V. 6. № 3. P. 566–574.
18. Thybaud V., Kasper P., Sobol Zh., Elhajouji A., Fellows M., Guerard M., Lynch A.M., Sutter A. and Tanir J.Y. Genotoxicity assessment of peptide/protein-related biotherapeutics: points to consider before testing // Mutagenesis. 2016. № 31. P. 375–384.
19. Castellino S., de Castiglione R., Forino R., Galantino M. and Pulci R. Mutagenic contaminants in synthetic peptides obtained by an azide coupling // Mutagenesis. 1991. V. 6. № 3. P. 185–187.



## Лекарственные препараты, разработанные ВИЛАР

**Флакозид** (таблетки) (рег. №№ 90/248/3; 90/248/7) – противовирусное и антигепатотоксическое средство, получаемое из листьев бархата амурского и бархата Лавалля (*Phellodéndron amurénse* и *Phellodendron amurense* var. *Lavallei* Sprague). Применяется для лечения вирусных гепатитов.

**Хелепин** (таблетки, мазь) рег. №№ 87/1186/10; 87/1186/7 – противовирусное средство при заболеваниях, вызываемых ДНК-геномными вирусами группы герпеса, получаемое из травы дикорастущего растения леспециды копеечниковой (*Lespedeza hedysaroides* (Pall.) Kitag.).

**Хелепин Д** (таблетки, мазь, глазные капли), рег. №№ 94/108/6; 94/108/7; 99/47/11 – противовирусное средство, получаемое из травы культивируемого растения десмодиума канадского (*Desmodium canadense* D.C.).

Тел. контакта: 8(495)388-55-09; 8(495)388-61-09; 8(495)712-10-45

Факс: 8(495)712-09-18;

e-mail: [vilarnii.ru](mailto:vilarnii.ru); [www.vilarnii.ru](http://www.vilarnii.ru)