

## ИЗУЧЕНИЕ ВОЗМОЖНЫХ МУТАГЕННЫХ СВОЙСТВ НОВОГО ЛЕКАРСТВЕННОГО СРЕДСТВА НА ОСНОВЕ КОМПЛЕКСА ЛИТИЯ, ОКСИДА АЛЮМИНИЯ И ПОЛИМЕТИЛСИЛОКСАНА

Владимир Иосифович КОНЕНКОВ<sup>1</sup>, Максим Александрович КОРОЛЕВ<sup>1</sup>,  
Алексей Александрович ЧУРИН<sup>2</sup>, Ольга Леонидовна ВОРОНОВА<sup>2</sup>,  
Оксана Владимировна НЕУПОКОЕВА<sup>2</sup>, Любовь Никифоровна РАЧКОВСКАЯ<sup>1</sup>,  
Анна Вениаминовна ШУРЛЫГИНА<sup>1</sup>, Маргарита Владимировна РОБИНСОН<sup>1</sup>,  
Анастасия Анатольевна КОТЛЯРОВА<sup>1</sup>, Татьяна Викторовна ПОПОВА<sup>1</sup>,  
Эдмунд Эдмундович РАЧКОВСКИЙ<sup>1</sup>, Павел Геннадьевич МАДОНОВ<sup>1</sup>,  
Андрей Юрьевич ЛЕТЯГИН<sup>1</sup>

<sup>1</sup> НИИ клинической и экспериментальной лимфологии – филиал ФИЦ Институт цитологии и генетики СО РАН 630060, г. Новосибирск, ул. Тимакова, 2

<sup>2</sup> НИИ фармакологии и регенеративной медицины им. Е.Д. Гольдберга Томского национального исследовательского медицинского центра 634028, г. Томск, просп. Ленина, 3

Цель исследования – оценить возможные мутагенные свойства нового лекарственного средства (ЛС) на основе литийсодержащей субстанции – комплекса лития цитрата, полиметилсилоксана и оксида алюминия. **Материал и методы.** Использованы методы тестирования мутагенности с помощью учета хромосомных аберраций в клетках костного мозга мышей линии СВА и соматической рекомбинации (мозаицизма) у *Drosophila melanogaster*. **Результаты.** Показано, что однократное внутрижелудочное введение ЛС в дозе 5000 мг/кг и пятикратное курсовое введение в дозе 400 мг/кг мышам линии СВА не увеличивает уровень цитогенетических нарушений в клетках костного мозга. Исследование ЛС в тесте соматического мозаицизма выявило, что оно в дозе 2000 мг/кг не увеличивает частоту появления мутаций у дрозофилы. **Заключение.** Однократное внутрижелудочное введение ЛС на основе литийсодержащей субстанции в дозе 5000 мг/кг и его курсовое введение (400 мг/кг × 5) не увеличивает уровень цитогенетических нарушений в клетках костного мозга мышей линии СВА. В тест-системе соматической рекомбинации (мозаицизма) на *D. melanogaster* не выявлено увеличения появления мутантных щетинок и пятен на теле и голове при использовании маркеров yellow и singed. Результаты исследования свидетельствуют о том, что изученное ЛС не обладает мутагенными свойствами.

**Ключевые слова:** мутагенность, лекарственное средство на основе комплекса лития цитрата, полиметилсилоксана и оксида алюминия, *Drosophila melanogaster*, соматические рекомбинации, мыши СВА, доклинические исследования.

**Автор для переписки:** Шурлыгина А.В., e-mail: anna\_v\_s@mail.ru

**Для цитирования:** Коненков В.И., Королев М.А., Чуринов А.А., Воронина О.Л., Неупокоева О.В., Рачковская Л.Н., Шурлыгина А.В., Робинсон М.В., Котлярова А.А., Попова Т.В., Рачковский Э.Э., Мадонов П.Г., Летягин А.Ю. Изучение возможных мутагенных свойств нового лекарственного средства на основе комплекса лития, оксида алюминия и полиметилсилоксана. *Сибирский научный медицинский журнал*. 2019; 39 (5): 62–67. doi: 10.15372/SSMJ20190507.

## STUDYING THE POSSIBLE MUTAGENIC PROPERTIES OF NEW MEDICINE ON THE BASIS OF COMPLEX LITHIUM CITRATE, ALUMINUM OXIDE AND POLYMETHILSILOXANE

Vladimir Iosifovich KONENKOV<sup>1</sup>, Maksim Aleksandrovich KOROLEV<sup>1</sup>,  
Aleksey Aleksandrovich CHURIN<sup>2</sup>, Olga Leonidovna VORONOVA<sup>2</sup>,  
Oksana Vladimirovna NEUPOKOEVA<sup>2</sup>, Lubov Nikiforovna RACHKOVSKAYA<sup>1</sup>,  
Anna Veniaminovna SHURLYGINA<sup>1</sup>, Margarita Vladimirovna ROBINSON<sup>1</sup>,  
Anastasiya Anatolevna KOTLYAROVA<sup>1</sup>, Tatyana Viktorovna POPOVA<sup>1</sup>,  
Edmund Edmundovich RACHKOVSKIY<sup>1</sup>, Pavel Gennadievich MADONOV<sup>1</sup>,  
Andrey Yurevich LETYAGIN<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Research Institute of Clinical and Experimental Lymphology –  
Branch of Federal Research Center Institute of Cytology and Genetics of SB RAS  
630060, Novosibirsk, Timakov str., 2

<sup>2</sup> Goldberg Research Institute of Pharmacology and Regenerative Medicine,  
Tomsk Scientific Research Center  
634028, Tomsk, Lenin av., 3

Aim of the study was to investigate the possible mutagenic properties of a new drug based on a lithium-containing substance – a complex of lithium citrate, polymethylsiloxane and aluminum oxide. **Material and methods.** Methods for testing mutagenicity using chromosomal aberrations in the bone marrow cells of CBA mice and somatic recombination in *Drosophila melanogaster* were used. **Results.** It was shown that a single intragastric administration of drug at a dose of 5000 mg/kg and a fivefold course of administration at a dose of 400 mg/kg to CBA mice did not increase the level of cytogenetic disorders in bone marrow cells. The study of the lithium complex drug in a somatic mosaicism test revealed that the preparation at a dose of 2000 mg/kg does not increase the frequency of mutations in *Drosophila melanogaster*. **Conclusion.** A single intragastric administration of the studied drug at a dose of 5000 mg/kg and its course administration (400 mg/kg × 5) do not increase the level of cytogenetic disorders in the bone marrow cells of CBA mice. In the somatic recombination (mosaicism) test system on *D. melanogaster*, no increase in the appearance of mutant setae and spots on the body and head was observed when using yellow and singed markers. The results of the study indicate that the studied drug does not have mutagenic properties.

**Key words:** mutagenicity, drug based on complex lithium citrate, polymethylsiloxane and alumina oxide, *Drosophila melanogaster*, somatic recombination, CBA mice, preclinical research.

**Correspondence author:** Shurlygina A.V., e-mail: anna\_v\_s@mail.ru

**Citation:** Konenkov V.I., Korolev M.A., Churin A.A., Voronova O.L., Neupokoeva O.V., Rachkovskaya L.N., Shurlygina A.V., Robinson M.V., Kotlyarova A.A., Popova T.V., Rachkovskiy E.E., Madonov P.G., Letyagin A.Yu. Studying the possible mutagenic properties of new medicine on the basis of complex lithium citrate, aluminum oxide and polymethylsiloxane. *Sibirskiy nauchnyy meditsinskiy zhurnal = Siberian Scientific Medical Journal*. 2019; 39 (5): 62–67. [In Russian]. doi: 10.15372/SSMJ20190507.

Литий считается золотым стандартом терапии биполярного расстройства; он используется в качестве терапии первой линии в профилактике и лечении острой мании и депрессии и эффективен в снижении риска суицида у пациентов с биполярным расстройством [7]. Однако длительная литиевая терапия может вызывать многочисленные токсические побочные эффекты [8]. Препараты лития с пролонгированным высвобождением имеют преимущество в том, что они обеспечивают более постоянные концентрации в сыворотке крови, приводящие к меньшему ко-

личеству побочных эффектов и удобству режима дозирования, с улучшением приверженности к терапии [6].

В НИИ клинической и экспериментальной лимфологии разработано новое лекарственное средство (ЛС) на основе литийсодержащей субстанции – комплекса лития цитрата, полиметилсилоксана и оксида алюминия для предупреждения и лечения психоэмоциональных нарушений, в частности, биполярных расстройств. Наличие в структуре ЛС пористых материалов-носителей повышает уровень безопасности использования

комплекса за счет адресной доставки лития в зону терапевтического действия и одновременного удаления токсических агентов из организма [1].

Цель работы – изучение возможных мутагенных свойств ЛС на мышах линии СВА и в соматических клетках *Drosophila melanogaster*.

## МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

Объектом исследования явилось ЛС – комплекс на основе лития цитрата, оксида алюминия и полиметилсилоксана (далее – «комплекс лития»), произведенное в ООО ФК «Санат» по разработанному в НИИ клинической и экспериментальной лимфологии Лабораторному регламенту № 7-015. ЛС в виде суспензии в 1%-м крахмальном геле вводили мышам линии СВА в первой серии эксперимента однократно внутрижелудочно только самцам с фиксацией клеточного материала через 24 ч. Во второй серии эксперимента ЛС вводили самцам и самкам ежедневно на протяжении 5 суток с фиксацией клеточного материала через 24 ч после последнего введения. В качестве негативного контроля использовали 1%-й крахмальный гель, позитивным контролем служил противоопухолевый препарат циклофосфан (ООО «КОМПАНИЯ «ДЕКО», г. Москва) в дозе 20 мг/кг (1/10 ЛД<sub>50</sub>). С целью накопления клеток, находящихся на стадии метафазы, животным вводили 0,025%-й колхицин кристаллический (Sigma-Aldrich, США), по 0,01 мл на 1 г массы животного.

Эксперименты выполнены на половозрелых самцах и самках мышей линии СВА (масса 18–25 г, возраст 2–3 мес.), конвенциональных 1-й категории, полученных из отдела экспериментального биомоделирования НИИ фармакологии и регенеративной медицины им. Е.Д. Гольдберга (г. Томск). Животных содержали в неполной барьерной системе в соответствии с правилами, принятыми Европейской конвенцией по защите позвоночных животных, используемых для экспериментальных и иных научных целей [5]. Эвтаназию проводили методом передозировки средства для ингаляционного наркоза (эфира) в замкнутой емкости (эксикаторе) через 24 ч после однократного и последнего курсового введения препаратов. Костный мозг из бедренной кости вымывали в центрифужную пробирку с 5 мл 0,56%-го раствора хлористого калия. Клетки костного мозга фиксировали, помещали на предметные стекла, окрашивали азуром II и эозином и проводили визуальный анализ метафаз под световым микроскопом при увеличении ок. 10, об. 90 с применением масляной иммерсии [9].

Учет соматической рекомбинации (мозаицизма) проводили с использованием мух *D. melanogaster*. Насекомых содержали при температуре 24 °С в плоскодонных пробирках диаметром 25 мм, высотой 100 мм, в которые добавляли по 5 мл питательной среды [3]. Использовали тестерные линии дрозофилы, полученные с кафедры цитологии и генетики Национального исследовательского Томского государственного университета. Токсичность ЛС устанавливали по выживаемости самок Р<sub>1</sub> (линия 1 – Д32 дикий тип), которая на максимальной из использованных доз не должна быть меньше 50 % [2]. После предварительного тестирования оказалось возможным взять в данный эксперимент максимально рекомендуемую дозу 2000 мг/кг. Использовали тестерные линии дрозофилы: линия 1 – yellow – генотип *y/y*; линия 2 – *w, sn<sup>3</sup>* – генотип *w sn<sup>3</sup>/Y*. Девственных самок линии yellow в количестве пять особей помещали вместе с пятью самцами линии *w, sn<sup>3</sup>* в пробирки, содержащие 5 мл стандартной питательной среды. Через 48–62 ч родителей пересаживали в пробирки со свежей питательной средой, а в прежние пробирки на поверхность питательной среды насыпали ЛС в дозе 10 мг на 5 мл питательной среды. Просмотр вылетевших особей начинали с 9–10-го дня после начала эксперимента. У гетерозиготных самок первого поколения регистрировали мутантные щетинки (макрохеты на голове, тораксе и скутеллюме) фенотипа yellow или *singed*. Регистрировали общее количество просмотренных самок, число самок с одиночными (*y, sn<sup>3</sup>*) и двойными (*y sn<sup>3</sup>*) пятнами. Всего просматривали не менее 1000 самок в опыте и контроле.

При статистической обработке полученных результатов вычисляли среднее арифметическое (*M*) и ошибку среднего арифметического (*SE*). Для оценки достоверности различий между группами применяли *t*-критерий Стьюдента и  $\chi^2$ , различия считали статистически значимыми при  $p < 0,05$ [4].

## РЕЗУЛЬТАТЫ

При исследовании действия однократного введения ЛС в группе животных, получавших растворитель (негативный контроль), все показатели хромосомных нарушений были достоверно ниже, чем у мышей, которым вводили циклофосфан (позитивный контроль). У мышей, получавших ЛС в дозах 5000 и 400 мг/кг, доля клеток костного мозга, имеющих хромосомные aberrации, была статистически значимо меньше, чем в группе позитивного контроля, и не отличалась от величины показателя группы негативного кон-

**Таблица 1.** Влияние ЛС на цитогенетические показатели костного мозга самцов мышей линии СВА при однократном внутрижелудочном введении,  $M \pm SE$  (%)

**Table 1.** The effect of drug on cytogenetic indices of bone marrow of CBA male mice after single intragastric administration,  $M \pm SE$  (%)

Показатель (количество)	Негативный контроль	Комплекс лития 5000 мг/кг	Комплекс лития 400 мг/кг	Циклофосфан (позитивный контроль)
Аберрации (на 100 клеток)				
одиночные фрагменты	1,20 ± 0,37	1,80 ± 0,86 <sup>#</sup>	1,00 ± 0,32 <sup>#</sup>	45,60 ± 3,08*
хромосомные хроматидные обмены	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00 <sup>#</sup>	0,00 ± 0,00 <sup>#</sup>	10,00 ± 2,14*
Аберрантные хромосомы	1,20 ± 0,37	1,80 ± 0,86 <sup>#</sup>	1,00 ± 0,32 <sup>#</sup>	63,60 ± 7,00*
Множественные повреждения	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00 <sup>#</sup>	0,00 ± 0,00 <sup>#</sup>	9,40 ± 0,75*
Ахроматические пробелы	0,40 ± 0,24	0,40 ± 0,24 <sup>#</sup>	0,40 ± 0,24 <sup>#</sup>	4,40 ± 1,36*
Клетки с аберрациями хромосом	1,60 ± 0,40	2,20 ± 0,97 <sup>#</sup>	1,40 ± 0,24 <sup>#</sup>	40,80 ± 0,66*

Примечание. Обозначены статистически значимые ( $p < 0,05$ ) отличия от величин соответствующих показателей: \* – негативного контроля, # – позитивного контроля.

**Таблица 2.** Влияние ЛС на цитогенетические показатели костного мозга мышей линии СВА при курсовом внутрижелудочном введении,  $M \pm SE$  (%)

**Table 2.** The effect of drug on cytogenetic indices of bone marrow of CBA male mice after course intragastric administration,  $M \pm SE$  (%)

Показатель (количество)	Негативный контроль	Комплекс лития 5000 мг/кг	Комплекс лития 400 мг/кг	Циклофосфан (позитивный контроль)
Одиночные фрагменты	1,00 ± 0,32	1,20 ± 0,20	1,00 ± 0,32	1,40 ± 0,24
Аберрантные хромосомы	1,00 ± 0,32	1,20 ± 0,20	1,00 ± 0,32	1,40 ± 0,24
Множественные повреждения	0,20 ± 0,20	0,20 ± 0,20	0,40 ± 0,24	0,60 ± 0,24
Ахроматические пробелы	1,20 ± 0,37	1,40 ± 0,24	1,40 ± 0,24	2,00 ± 0,32
Клетки с аберрациями хромосом	1,00 ± 0,32	1,20 ± 0,20	1,00 ± 0,32	1,40 ± 0,24

Примечание. В каждой группе исследовано по 500 клеток.

**Таблица 3.** Учет соматической рекомбинации у *D. melanogaster* при использовании маркеров yellow и singed

**Table 3.** Accounting for somatic recombination in *D. melanogaster* using the yellow and singed markers

Показатель	Контроль	Комплекс лития
Общее число просмотренных самок	1002	1001
Число мутантных пятен «sn <sup>3</sup> »	1	2
Число мутантных пятен «y»	0	0
Число мутантных пятен «y sn <sup>3</sup> »	0	0
Всего мутантных пятен	1	2

троля (табл. 1). Во второй серии эксперимента, в которой испытуемое средство и растворитель вводили внутрижелудочно в течение пяти дней в дозе 400 мг/кг 10 самцам и 10 самкам, достоверных отличий от групп негативного контроля не выявлено (табл. 2); можно сделать вывод, что курсовое пятикратное введение ЛС в дозе 400 мг/кг у самцов и самок мышей не изменяет доли поврежденных метафаз в костном мозге и не увели-

чивает количество клеток с пробелами хромосом по сравнению с контролем.

В ходе исследования мутагенности ЛС при анализе 1001 просмотренной самки *D. melanogaster* в опытной группе (введение в питательную среду ЛС в дозе 10 мг на 5 мл среды) обнаружено два одиночных пятна с фенотипом sn<sup>3</sup>, одиночных (y) и двойных (y sn<sup>3</sup>) пятен не отмечено (табл. 3); по сравнению с контролем достоверных отличий

в появлении самок с мутациями не обнаружено ( $\chi^2 = 0,33$ ). Таким образом, ЛС не является токсичным в данном тесте.

#### ЗАКЛЮЧЕНИЕ

На основании полученных данных можно сделать вывод, что однократное внутрижелудочное введение изученного ЛС в дозе 5000 мг/кг и его курсовое введение (400 мг/кг  $\times$  5) не увеличивает уровень цитогенетических нарушений в клетках костного мозга мышей линии СВА. В тест-системе соматической рекомбинации (мозаицизма) на *D. melanogaster* не выявлено увеличения появления мутантных щетинок и пятен на теле и голове при использовании маркеров yellow и singed. Таким образом, изученное ЛС не обладает мутагенными свойствами и безопасно с точки зрения возможного негативного воздействия на генетический аппарат клеток организма.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Бородин Ю.И., Рачковская Л.Н., Дарнева И.С., Новоселова Т.И. Энтеросорбент Ноолит. Для физической и психологической реабилитации. Новосибирск: Сова, 2006. 221 с.

Borodin Yu.I., Rachkovskaya L.N., Darneva I.S., Novoselova T.I. Enterosorbent Noolite. For physical and psychological rehabilitation. Novosibirsk: Sova, 2006. 221 p. [In Russian].

2. Дурнев А.Д., Гуськова Т.А., Ревазова Ю.А., Меркулов В.А., Верстакова О.Л., Журков В.С., Сычева Л.П., Жанатаев А.К., Юрченко В.В. Методические рекомендации по оценке мутагенных свойств лекарственных средств. В кн.: Руководство по про-

ведению доклинических исследований лекарственных средств. Часть первая. М.: Гриф и К, 2012. 94–114.

Durnev A.D., Guskova T.A., Revazova Yu.A., Merkulov V.A., Verstakova O.L., Zhurkov V.S., Sycheva L.P., Zhanataev A.K., Yurchenko V.V. Methods for genetic risk assessment. In: Mironov A.N, editor. Guidelines for pre-clinical trials of drugs. Part one. Moscow: Grif i K, 2012. 94–114. [In Russian].

3. Медведев Н.Н. Практическая генетика. М.: Наука, 1968. 296 с.

Medvedev N.N. Practical genetics. M.: Nauka, 1968. 296 p. [In Russian].

4. Реброва О.Ю. Статистический анализ медицинских данных. Применение пакета прикладных программ STATISTICA. М.: Медиа-Сфера, 2002. 312 с.

Rebrova O.Yu. Statistical analysis of medical data. Application software package STATISTICA. Moscow: Media-Sfera, 2002. 312 p. [In Russian].

5. European Convention for the Protection of Vertebrate Animals Used for Experimental and other Scientific Purposes (ETS 123). Strasbourg, 1986.

6. Girardi P., Brugnoli R., Manfredi G., Sani G. Lithium in bipolar disorder: Optimizing therapy using prolonged-release formulations. *Drugs R D*, 2016; 16 (4): 293–302

7. Malhi G.S., Tanious M., Das P., Berk M. The science and practice of lithium therapy. *Aust. N. Z. J. Psychiatry*. 2012; 46 (3): 192–211

8. Pastor N., Kaplan C., Domínguez I., Mateos S., Cortés F. Cytotoxicity and mitotic alterations induced by non-genotoxic lithium salts in CHO cells *in vitro*. *Toxicol. In Vitro*. 2009; 23 (3): 432–438

9. Rubtsov N.B., Borisov Yu.M. Sequence composition and evolution of mammalian B chromosomes. *Genes*. 2018; 9 (10): pii: E490.

**Сведения об авторах:**

**Коненков В.И.**, д.м.н., проф., академик РАН, ORCID: 0000-0001-7385-6270, e-mail: vikonenkov@gmail.com

**Королев М.А.**, к.м.н., ORCID: 0000-0002-4890-0847, e-mail: kormax@bk.ru

**Чурин А.А.**, д.м.н., e-mail: churin\_aa@pharmso.ru

**Воронова О.Л.**, к.б.н., старший научный сотрудник, e-mail: oylos@rambler.ru

**Неупокоева О.В.**, к.б.н., младший научный сотрудник, e-mail: repaov@mail.ru

**Рачковская Л.Н.**, к.х.н., e-mail: noolit@niikel.ru

**Шурлыгина А.В.**, д.м.н., проф., ведущий научный сотрудник, ORCID: 0000-0002-3576-9456,  
e-mail: anna\_v\_s@mail.ru

**Робинсон М.В.**, д.б.н., старший научный сотрудник, e-mail: mil777@ngs.ru

**Котлярова А.А.**, к.б.н., e-mail: kotlyarova.anastasiya@yandex.ru

**Попова Т.В.**, младший научный сотрудник, e-mail: argentum.popova@mail.ru

**Рачковский Э.Э.**, к.х.н., старший научный сотрудник, e-mail: reed@academ.org

**Мадонов П.Г.**, д.м.н., ORCID: 0000-0002-1093-8938, e-mail: pmadonov@yandex.ru

**Летягин А.Ю.**, д.м.н., проф., ORCID: 0000-0002-9293-4083, e-mail: letyagin-andrey@yandex.ru

**Information about author:**

**Konenkov V.I.**, doctor of medical sciences, professor, academician of the RAS, ORCID: 0000-0001-7385-6270,  
e-mail: vikonenkov@gmail.com

**Korolev M.A.**, candidate of medical sciences, ORCID: 0000-0002-4890-0847, e-mail: kormax@bk.ru

**Churin A.A.**, doctor of medical sciences, e-mail: churin\_aa@pharmso.ru

**Voronova O.L.**, candidate of biological sciences, e-mail: oylos@rambler.ru

**Neupokoeva O.V.**, candidate of biological sciences, e-mail: repaov@mail.ru

**Rachkovskaya L.N.**, candidate of chemical sciences, e-mail: noolit@niikel.ru

**Shurlygina A.V.**, doctor of medical sciences, professor, ORCID: 0000-0002-3576-9456, e-mail: anna\_v\_s@mail.ru

**Robinson M.V.**, doctor of biological sciences, e-mail: mil777@ngs.ru

**Kotlyarova A.A.**, candidate of biological sciences, e-mail: kotlyarova.anastasiya@yandex.ru

**Popova T.V.**, e-mail: argentum.popova@mail.ru

**Rachkovskiy E.E.**, candidate of chemical sciences, e-mail: reed@academ.org

**Madonov P.G.**, doctor of medical sciences, ORCID: 0000-0002-1093-8938, e-mail: pmadonov@yandex.ru

**Letyagin A.Yu.**, doctor of medical sciences, professor, ORCID: 0000-0002-9293-4083,  
e-mail: letyagin-andrey@yandex.ru