

ОЦЕНКА МУТАГЕННОГО ПОТЕНЦИАЛА ПРОИЗВОДНОГО ВАЛЬПРОЕВОЙ КИСЛОТЫ С ТРЕТИЧНОЙ АМИНОГРУППОЙ

Е. А. Золотоверхая , Л. Г. Кубарская, А. Я. Беспалов, А. С. Мелехова

Научно-клинический центр токсикологии имени С. Н. Голикова Федерального медико-биологического агентства, Санкт-Петербург, Россия

Моделирование тяжелого отравления ингибиторами ацетилхолинэстеразы показало возможность фармакологической терапии токсических проявлений препаратом вальпроевой кислоты с третичной аминогруппой. Целью работы было исследовать потенциальную мутагенную активность вальпроевой кислоты с третичной аминогруппой в рамках изучения ее безопасности. Анализ наличия токсикофоров и оценку вероятности проявления мутагенности выполняли с использованием автономного программного обеспечения QSAR Toolbox (v4.5 SP1). Для оценки мутагенного потенциала вальпроевой кислоты с третичной аминогруппой *in vitro* использовали тест Эймса с метаболической активацией и без. Результаты компьютерного прогнозирования предсказали отсутствие мутагенного действия изучаемой субстанции в тесте Эймса. Данные были подтверждены в тесте Эймса *in vitro* для широкого диапазона концентраций вальпроевой кислоты с третичной аминогруппой (0,02–5,0 мг/мл). В концентрации выше 1,58 мг/мл вальпроевая кислота с третичной аминогруппой обладает бактериостатическим действием на штаммы *S. typhimurium* TA 100 и *E. coli* WP2 uvr A pKM 101. Таким образом, производное вальпроевой кислоты с третичной аминогруппой не обладает потенциальным мутагенным действием, его можно рекомендовать для дальнейшего исследования терапевтической эффективности и безопасности в доклинических исследованиях.

Ключевые слова: вальпроевая кислота, ингибиторы ацетилхолинэстеразы, компьютерное прогнозирование, мутагенность, тест Эймса, холиноблокаторы

Финансирование: работа выполнена в рамках государственного задания НИР «Изучение эффективности и безопасности субстанции аминоксифира вальпроевой кислоты как лекарственного препарата фармакотерапии токсического судорожного синдрома», номер НИОКТР 121041500281-1.

Вклад авторов: Е. А. Золотоверхая — планирование исследования, проведение анализа *in silico*, статистическая обработка и интерпретация данных, подготовка рукописи; Л. Г. Кубарская: проведение экспериментов *in vitro*, сбор и анализ данных; А. Я. Беспалов — синтез исследуемого вещества, интерпретация результатов исследования, редактирование статьи; А. С. Мелехова — редактирование статьи, подготовка сопроводительных документов для опубликования.

Соблюдение этических стандартов: исследование выполнено *in silico* и *in vitro* на бактериальных штаммах, одобрение этического комитета не требуется.

 **Для корреспонденции:** Екатерина Андреевна Золотоверхая
ул. Бехтерева, д. 1, г. Санкт-Петербург, 192019, Россия; e.zolotoverkhaja@yandex.ru

Статья получена: 20.06.2023 **Статья принята к печати:** 23.08.2023 **Опубликована онлайн:** 15.09.2023

DOI: 10.47183/mes.2023.027

ESTIMATION OF MUTAGENIC POTENTIAL OF THE VALPROIC ACID DERIVATIVE CONTAINING A TERTIARY AMINO GROUP

Zolotoverkhaja EA , Kubarskaya LG, Bepalov AY, Melekhova AS

Golikov Research Clinical Center of Toxicology of Federal Medical and Biological Agency, Saint-Petersburg, Russia

The model of severe poisoning with acetylcholinesterase inhibitors has shown the possibility of drug treatment of toxic effects with valproic acid containing a tertiary amino group. The study was aimed to assess potential mutagenic effects of the valproic acid derivative containing a tertiary amino group when studying its safety. Testing for toxicophores and assessment of the mutagenic effect probability were performed using the QSAR Toolbox offline software (v4.5 SP1). The Ames test with and without metabolic activation was used to estimate mutagenic potential of valproic acid containing a tertiary amino group *in vitro*. The computer prediction results predicted that the test substance would show no mutagenic effects in the Ames test. These data were confirmed by the *in vitro* Ames test for a broad range of concentrations of valproic acid containing a tertiary amino group (0.02–5.0 mg/mL). The concentrations of valproic acid containing a tertiary amino group exceeding 1.58 mg/mL have a bacteriostatic effect on the TA 100 *S. typhimurium* strain and the WP2 uvr A pKM 101 *E. coli* strain. Thus, the valproic acid derivative containing a tertiary amino group possesses no mutagenic effect, it can be recommended for further preclinical trials of therapeutic efficacy and safety.

Keywords: valproic acid, acetylcholinesterase inhibitors, computer prediction, mutagenicity, Ames test, anticholinergics

Funding: the study was performed as part of the State Assignment "Assessment of Efficacy and Safety of the Valproic Acid Amino Ester Substance as an Agent for Drug Treatment of the Toxin-Induced Seizures", R&D project № 121041500281-1.

Author contribution: Zolotoverkhaja EA — study planning, *in silico* analysis, statistical analysis and data interpretation, manuscript writing; Kubarskaya LG — *in vitro* experiments, data acquisition and analysis; Bepalov AY — synthesis of the test compound, data interpretation, manuscript editing; Melekhova AS — manuscript editing, preparing supportive documents for publishing.

Compliance with ethical standards: the study was performed *in silico* and *in vitro*, no approval by the Ethics Committee was required.

 **Correspondence should be addressed:** Ekaterina A. Zolotoverkhaja
Bekhtereva, 1, Saint-Petersburg, 192019, Russia; e.zolotoverkhaja@yandex.ru

Received: 20.06.2023 **Accepted:** 23.08.2023 **Published online:** 15.09.2023

DOI: 10.47183/mes.2023.027

Фосфорорганические соединения и карбаматы являются распространенными инсектицидами, которые подавляют активность холинэстераз, вызывая острые проявления мускариноподобного отравления и некоторые симптомы никотиноподобного отравления [1]. Кроме того, обратимые ингибиторы ацетилхолинэстеразы все чаще используются для фармакологической поддержки пациентов с нейроденегеративными заболеваниями [2, 3]. С ростом

применения ингибиторов ацетилхолинэстеразы в качестве инсектицидов и фармакологических препаратов растет риск как бытовых, так и производственных отравлений, что требует немедленного медицинского вмешательства. При высоких уровнях воздействия ингибирование холинэстераз быстро приводит к накоплению нейромедиатора ацетилхолина, эндогенного лиганда мускариновых и никотиновых рецепторов [4].

Внезапное и быстрое повышение уровня ацетилхолина в синапсах ведет к гиперстимуляции холинергических рецепторов и симптомам холинергического криза. В качестве антидота при отравлении, в том числе ингибиторами ацетилхолинэстеразы наиболее широко используют атропин [5]. Недостаточный защитный эффект атропина, обусловленный отсутствием никотинолитического эффекта, а также риск избыточной атропинизации при оказании медицинской помощи обуславливает необходимость создания препаратов, обладающих активностью центрального холиноблокатора с минимальной токсичностью.

В ФГБУ НКЦТ им. С. Н. Голикова ФМБА России синтезирован препарат нейромодуляторного действия — (1-метилпиперидин-4-ил)-2-пропилпентаноата гидрохлорид (производное вальпроевой кислоты с третичной аминогруппой) [6]. При моделировании тяжелого отравления карбатами на крысах показана разносторонняя фармакологическая активность данного препарата, ему присущи как холиноблокирующее действие, так и противосудорожный эффект [7].

На начальном этапе изучения токсического действия фармакологически активных веществ используют компьютерные предсказательные методы *in silico*, позволяющие экспериментальные исследования *in vitro* и *in vivo*. В рамках изучения безопасности исследуемого вещества необходимо оценить его потенциальную мутагенную активность. При выявлении мутагенного потенциала нового соединения следует учитывать наличие функциональных групп, определяющих проявления токсичности, а также имеющиеся экспериментальные данные о близких по строению веществах [8]. Для этого используются специальные компьютерные программы, которые позволяют на основе анализа структурного сходства и наличия токсикаторов оценить генотоксический потенциал перспективных фармакологически активных веществ [9]. В качестве первоначального скрининга для определения мутагенного потенциала новых фармакологических препаратов *in vitro* используют тест Эймса [10].

Целью данного исследования было изучение потенциальной мутагенной активности производного вальпроевой кислоты с третичной аминогруппой в тестах *in silico* и *in vitro*.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Объект исследования

Объектом исследования является (1-метилпиперидин-4-ил)-2-пропилпентаноата гидрохлорид (производное вальпроевой кислоты с третичной аминогруппой), синтезированный в лаборатории синтеза лекарственных препаратов ФГБУ НКЦТ им. С. Н. Голикова ФМБА России. Исследование *in silico* проводили с использованием формулы SMILES исследуемого вещества: CCCC(CCC)C(=O)OC1CCN(C)CC1.

Определение мутагенного потенциала *in silico*

Анализ структурных фрагментов, указывающих на потенциальную генотоксичность производного вальпроевой кислоты с третичной аминогруппой, выявление вероятных механизмов мутагенного действия и оценка вероятности проявления мутагенной активности в

тесте Эймса на основании имеющихся экспериментальных данных о близких по строению веществах были проведены с помощью автономного программного обеспечения QSAR Toolbox (v4.5 SP1).

Конечными точками исследования были выбраны обратные мутации на бактериях *S. typhimurium* TA 1535, TA 1537, TA 98, TA 100 с метаболической активацией и без, а также *E. coli* WP2 *uvr* A pKM 101 с метаболической активацией и без.

В качестве алгоритмов идентификации специфических особенностей исследуемого соединения, т. е. профилирования, были подобраны имеющиеся для выбранных конечных точек профилировщики: «ДНК предупреждения для теста Эймса, хромосомных аббераций и микроядерного теста по протоколу лаборатории математической химии, Бургас, Болгария» («ДНК предупреждения для AMES, CA и MNT от OASIS»), «предупреждения о мутагенности *in vitro* (для теста Эймса) по протоколу Высшего института здоровья, Рим, Италия» («предупреждения о мутагенности *in vitro* (Ames) от ISS»), «связывание с ДНК по протоколу от Организации экономического сотрудничества и развития» («связывание с ДНК от OECD») и «связывание ДНК по протоколу лаборатории математической химии, Бургас, Болгария» («связывание ДНК от OASIS»).

Первичную, основанную на структуре, выборку химических веществ, аналогичных исследуемому производному вальпроевой кислоты с третичной аминогруппой, проводили по наличию следующих функциональных групп: разветвленный алкан с третичным углеродом, или третичный амин, или эфир карбоновой кислоты, или насыщенный гетероциклический фрагмент, или пиперидин, или третичный алифатический амин.

Уточнение категорий по специфическому механизму связывания с ДНК, определенному для исследуемого производного вальпроевой кислоты с третичной аминогруппой, проводили по алгоритму «ДНК предупреждения для теста Эймса, хромосомных аббераций и микроядерного теста лаборатории математической химии, Бургас, Болгария (OASIS)» («ДНК предупреждения для AMES, CA и MNT от OASIS»). Данный алгоритм учитывает вероятную генетическую токсичность (например, генные мутации в тестах *in vivo* и *in vitro*, повреждение и/или репарацию ДНК, повреждение ДНК и/или белка в печени, хромосомные абберации, трансгенную мутацию грызунов) и канцерогенность. Категоризация по структуре вещества проведена профилировщиком «органических функциональных групп» от Агентства по охране окружающей среды США (US EPA).

Тест Эймса

Для проведения исследования использовали набор MPF™ Penta 1 (Xenometrix; Швейцария), который содержит в своем составе все необходимые микробиологические среды и добавки, соответствующие штаммы микроорганизмов, положительные контроли компонент микросомной фракции печени крыс S9. Исследование выполняли в трех повторах для каждой концентрации производного вальпроевой кислоты с третичной аминогруппой. Исследование проводили в варианте с метаболической активацией системы микросомной Ароклор-1254-индуцированной фракцией гомогената печени S9 с кофакторами НАДФ и глюкозо-6-фосфатом и в варианте без активации микросомной фракцией S9.

Выбор диапазона концентраций выполняли на ночной культуре штамма *S. typhimurium* TA98 с целью отбора максимальной концентрации тестируемого вещества, при которой оно не проявит цитотоксический эффект, а также для оценки растворимости препарата в условиях эксперимента. В качестве растворителя использовали стерильную воду для инъекций. Исследуемые концентрации в предварительном тесте составили 0,01 мг/мл, 0,02 мг/мл, 0,05 мг/мл, 0,16 мг/мл, 0,50 мг/мл, 1,58 мг/мл и 5,00 мг/мл. Наличие признаков цитотоксичности определяли по отсутствию роста культуры при определенной концентрации исследуемого вещества.

Анализ данных

Достоверность различий биномиальных распределений в тесте Эймса определяли по совокупному биномиальному критерию [11, 12]. Совокупная биномиальная вероятность (*B*-value) более 0,99 показывает, что результат исследования обусловлен мутагенным действием препарата с вероятностью $\geq 99\%$. Кроме вероятностного критерия учитывали кратность превышения числа колоний ревертантов относительно базовой линии. Базовую линию вычисляли как сумму среднего числа спонтанных реверсий (ревертантов в отрицательном контрольном образце) и стандартного отклонения. В случае если базовая линия была превышена менее чем в 2 раза, результат не считали достоверным и не рассматривали как положительный эффект. При выявлении концентрационной зависимости эффекта или кратного превышения относительно базовой линии более чем в 2 раза тестируемый препарат классифицировали как мутаген. Данные, которые значительно меньше уровня спонтанных реверсий (*B*-value $\leq 0,01$), могут указывать на наличие цитотоксического действия препарата.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Определение мутагенного потенциала *in silico*

Экспериментальные данные по исследованию производного вальпроевой кислоты с третичной аминогруппой в базах данных, которые использует программное обеспечение QSAR Toolbox (v4.5 SP1), не выявлены, препарату CAS номер не присвоен.

В результате профилирования по неспецифическим конечным точкам не выявлены «предупреждения о мутагенности *in vitro* (Ames) от ISS» и «предупреждения ДНК для AMES, CA и MNT от OASIS» для системы без метаболической активации и с метаболической активацией. Результат применения общего механистического подхода по алгоритму «связывания с ДНК от OASIS» не выявил предупреждений, а алгоритм «связывания с ДНК от OECD» предупреждает о вероятной реакции мононуклеофильного замещения с образованием реактивного иминиевого иона.

Первичная выборка химических веществ, аналогичных исследуемому производному вальпроевой кислоты по критерию «органических функциональных групп» из базы данных Европейского химического агентства, составила 12 963 соединения. Из них 2300 соединений имели данные для конечной точки «исследование обратных мутаций на бактериях *S. typhimurium* TA 1535, TA 1537, TA 98, TA 100 с метаболической активацией и без» и 299 для конечной точки «исследование обратных мутаций на бактериях *E. coli* WP2 *uvr* A pKM 101 с метаболической активацией и без».

Дальнейшую процедуру подбора аналогов проводили по специфическим механизмам связывания с ДНК, идентифицированным для производного вальпроевой кислоты. Среди аналогов, для которых доступны экспериментальные данные, были найдены химические вещества и с положительными, и с отрицательными результатами теста Эймса на штаммах *S. typhimurium* TA 1535, TA 1537, TA 98, TA 100 и *E. coli* WP2 *uvr* A pKM 101. Кроме того, программа выдала предупреждение о наличии в базе химических соединений, отличающихся от исследуемого вещества. В связи с этим для уточнения базы данных были использованы профилировщики «ДНК предупреждения для AMES, CA и MNT от OASIS», «органические функциональные группы» от Агентства по охране окружающей среды CCHA (US EPA) и «структурное сходство». В результате были выбраны 80 химических соединений, близких по структуре и характеру взаимодействия с ДНК, для которых доступны экспериментальные данные по тесту Эймса на штаммах *S. typhimurium* TA 1535, TA 1537, TA 98, TA 100, и 33 химических соединения, близких по структуре и характеру взаимодействия с ДНК, для которых доступны экспериментальные данные по тесту Эймса на штаммах *E. coli* WP2 *uvr* A pKM 101 с метаболической активацией и без. Ни один из аналогов в тесте не показал мутагенной активности. Прогноз *in silico*, основанный на результатах тестирования 5 наиболее близких аналогов, на уровне значимости 0,00412 предсказывал отсутствие мутагенного действия аминоэфира вальпроевой кислоты в тесте Эймса на штаммах *S. typhimurium* TA 1535, TA 1537, TA 98, TA 100 и *E. coli* WP2 *uvr* A pKM 101 с метаболической активацией и без.

Определение исследуемого диапазона концентраций вещества

Производное вальпроевой кислоты с третичной аминогруппой в диапазоне исследуемых концентраций цитотоксического действия не проявило. В условиях предварительного теста все исследуемые концентрации оставались растворимыми. Поэтому тест Эймса выполняли в диапазоне концентраций от 0,02 мг/мл до 5 мг/мл с шагом в половину порядка (0,02 мг/мл, 0,05 мг/мл, 0,16 мг/мл, 0,50 мг/мл, 1,58 мг/мл, 5,00 мг/мл).

Результаты тестирования без метаболической активации системы

В табл. 1 представлено среднее и стандартное отклонение ($M \pm SD$) количества лунок с ревертантными колониями в серии из трех повторений по 48 ячеек для каждой исследуемой концентрации субстанции аминоэфира вальпроевой кислоты, положительных и отрицательных контролей в системе без активации микросомной фракцией.

В качестве положительных контролей использовали стандартные мутагены – 2-нитрофлуорен (2,0 мкг/мл для штамма TA98), N-оксид-4-нитрохинолин (0,1 мкг/мл для штамма TA100), N4-аминоцитидин (100 мкг/мл для штамма TA1535), 9-аминоакридин (15 мкг/мл для штамма TA1537), N-оксид-4-нитрохинолин (2,0 мкг/мл для штаммов wp2 *uvr*A и wp2 [pKM101]), которые эффективно индуцировали обратные мутации в бактериальных клетках. Среднее количество ревертантных колоний отрицательного контроля для всех штаммов не превышало максимально допустимые значения.

Таблица 1. Результаты тестирования аминоксифира вальпроевой кислоты с третичной аминогруппой в тесте Эймса без активации микросомной фракцией (M ± SD)

Тестируемое вещество	Концентрация	Штаммы				
		TA98	TA100	TA1535	TA1537	<i>E. coli</i> Combo
Аминоксифир вальпроевой кислоты	0,02 мг/мл	0,7 ± 0,6	5,7 ± 1,2	2,7 ± 1,5	0,0 ± 0,0	5,7 ± 2,0
	0,05 мг/мл	0,7 ± 0,6	5,3 ± 2,1	0,0 ± 0,0	1,7 ± 0,6	7,3 ± 0,6
	0,16 мг/мл	0,7 ± 0,6	7,7 ± 2,1	0,3 ± 0,6	1,0 ± 0,0	6,0 ± 1,0
	0,50 мг/мл	1,0 ± 0,0	5,3 ± 3,2	1,0 ± 1,0	1,0 ± 0,0	8,0 ± 2,0
	1,58 мг/мл	0,3 ± 0,6	4,3 ± 0,6	0,7 ± 1,2	1,7 ± 2,1	3,3 ± 1,2
	5,00 мг/мл	1,3 ± 2,3	1,7 ± 2,1*	0,0 ± 0,0	1,0 ± 1,0	0,0 ± 0,0*
Отрицательный контроль	0	1,2 ± 1,2	7,6 ± 3,2	1,3 ± 1,2	1,6 ± 2,6	6,2 ± 3,9
Базовая линия отрицательного контроля	–	2,4	10,8	2,5	4,2	10,1
Положительный контроль для штамма TA 98	2,0 мкг/мл	47,6 ± 1,1	–	–	–	–
Положительный контроль для штамма TA 100	0,1 мкг/мл	–	46,3 ± 2,5	–	–	–
Положительный контроль для штамма TA1535	100 мкг/мл	–	–	48,0 ± 0,0	–	–
Положительный контроль для штамма TA1537	15 мкг/мл	–	–	–	48,0 ± 0,0	–
Положительный контроль для штаммов <i>E. coli</i> Combo	2,0 мкг/мл	–	–	–	–	34,0 ± 3,7

Примечание: # — снижение уровня спонтанных реверсий (B -value $\leq 0,01$).

По результатам исследования аминоксифир вальпроевой кислоты в концентрациях 0,02 мг/мл, 0,05 мг/мл, 0,16 мг/мл, 0,5 мг/мл, 1,58 мг/мл и 5,00 мг/мл не индуцировал мутации в системе без метаболической активации.

Для штамма TA100 *S. typhimurium* и смеси штаммов *E. coli* wr2 uvrA и wr2 [rKM101] (*E. coli* Combo) при концентрации аминоксифира вальпроевой кислоты 5,0 мг/мл в системе без метаболической активации отмечено снижение количества ревертантных колоний по сравнению с уровнем спонтанных реверсий в отрицательном контрольном образце данного штамма и количеством ревертантных колоний при более низких концентрациях исследуемой субстанции. Критерий B -value составил менее 0,01, что может свидетельствовать о бактериостатическом действии аминоксифира вальпроевой кислоты в концентрации свыше 5,0 мг/мл на данные штаммы.

Результаты тестирования с активацией системы микросомной фракцией S9 (+S9)

В табл. 2 представлено среднее количество ревертантных колоний и стандартное отклонение (M ± SD) трех повторов для каждого штамма в системе с активацией микросомной фракцией S9.

В качестве положительного контроля для всех штаммов использовали 2-аминоантрацен в различных концентрациях. При тестировании субстанций в присутствии микросомной фракции S9 среднее количество мутантных колоний в секциях, содержащих положительный контроль, было выше минимально допустимого значения. Среднее количество колоний с обратными мутациями в секциях, содержащих отрицательный контроль, в присутствии микросомной фракции S9 не превышало максимально допустимые значения.

В системе с метаболической активацией аминоксифир вальпроевой кислоты в исследуемом диапазоне концентраций не индуцировал мутации.

Для штамма TA100 *S. typhimurium* при концентрации аминоксифира вальпроевой кислоты 5,0 мг/мл и смеси штаммов *E. coli* Combo при концентрации производного вальпроевой кислоты 1,58 мг/мл и 5,0 мг/мл в системе с метаболической активацией отмечено снижение количества ревертантных колоний по сравнению с уровнем спонтанных реверсий в отрицательном контрольном образце данного штамма и количеством ревертантных колоний при более низких концентрациях исследуемой субстанции. Критерий B -value составил менее 0,01, что подтверждает предположение о цитотоксическом действии производного вальпроевой кислоты в концентрации более 1,58 мг/мл на данные штаммы.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Программное обеспечение QSAR Toolbox (v4.5 SP1) использует более 50 баз данных химических веществ и включает информацию примерно о 100 000 веществ. Исследуемая вальпроевая кислота с третичной аминогруппой не выявлена в используемых базах данных, что говорит об отсутствии результатов открытых исследований данного вещества.

Метаболическая активация относительно инертных функциональных групп в реакционно способные электрофильные интермедиаты считается обязательным событием в этиологии многих побочных реакций, вызванных приемом лекарств. Поэтому исследования биохимической реактивности функциональных групп и структурных мотивов потенциальных фармакологических веществ важны с точки зрения безопасности. А предупреждения, полученные в результате профилирования, следует учитывать при планировании дальнейших доклинических и клинических испытаний [13].

Механистические профилировщики, использованные в исследовании, включают предупреждения, которые основаны на химии реакций, связанных с генотоксичностью, и на основе гипотезы о том, что

Таблица 2. Результаты тестирования аминоксифира вальпроевой кислоты с третичной аминогруппой в тесте Эймса с метаболической активацией микросомной фракцией S9 (M ± SD)

Тестируемое вещество	Концентрация	Штаммы				
		TA98	TA100	TA1535	TA1537	<i>E. coli</i> Combo
Аминоксифир вальпроевой кислоты	0,02 мг/мл	0,7 ± 0,6	8,7 ± 3,2	1,0 ± 0,0	1,3 ± 0,6	10,0 ± 1,0
	0,05 мг/мл	0,7 ± 1,2	8,0 ± 0,0	1,3 ± 1,2	1,7 ± 1,5	8,3 ± 1,5
	0,16 мг/мл	1,0 ± 1,0	10,0 ± 3,6	2,3 ± 2,3	0,7 ± 0,6	8,0 ± 3,0
	0,50 мг/мл	1,3 ± 1,2	13,0 ± 1,0	1,3 ± 0,6	2,7 ± 0,6	8,0 ± 0,0
	1,58 мг/мл	3,0 ± 2,0	17,3 ± 1,5	1,3 ± 0,6	0,7 ± 0,6	0,7 ± 0,6#
	5,00 мг/мл	0,0 ± 0,0	1,3 ± 0,6#	0,3 ± 0,6	0,7 ± 0,6	0,0 ± 0,0#
Отрицательный контроль	0	1,0 ± 1,2	8,4 ± 2,6	1,5 ± 1,2	0,8 ± 0,8	7,2 ± 4,2
Базовая линия отрицательного контроля	–	2,2	11,0	2,7	1,6	11,4
2-аминоантрацен	1,0 мкг/мл	47,9 ± 0,5	–	–	–	–
2-аминоантрацен	2,5 мкг/мл	–	48,0 ± 0,2	43,8 ± 3,1	41,3 ± 7,1	–
2-аминоантрацен	400 мкг/мл	–	–	–	–	30,0 ± 8,1

Примечание: # — снижение уровня спонтанных реверсий (B-value ≤ 0,01).

электрофильный потенциал химического вещества связан с генотоксическими свойствами [14]. Согласно алгоритму «связывания с ДНК от OASIS» химическое строение вальпроевой кислоты с третичной аминогруппой не ассоциировано с генотоксичностью, при этом алгоритм «связывания с ДНК от OECD» предупреждает о вероятной реакции мононуклеофильного замещения с образованием реактивного иминиевого иона как о потенциальном пути образования аддуктов ДНК [15].

Образование аддуктов ДНК может ослабить связь между азотистым основанием и дезоксирибозой и привести к потере основания (депурированию или депиримидинированию). В результате такой модификации ДНК образуется нестабильный апуриновый или апириимидиновый сайт (AP-сайт). Отсутствие кодирующего основания в матрице ДНК может приводить к блокированию ДНК- и РНК-полимераз, а также к однонуклеотидным заменам и делециям/инсерциям. Химическая реакционная способность AP-сайтов является причиной образования разрывов в молекуле ДНК, а также сшивок ДНК-белок и ДНК-ДНК, что обуславливает высокую мутагенность и цитотоксичность этих повреждений [16].

Кроме вероятной генотоксичности, образование реактивного иминиевого иона в результате метаболических реакций может приводить и к органоспецифичной токсичности. Нейротоксичность галоперидола, который, как и производное вальпроевой кислоты, имеет в структуре молекулы 4-пиперидинил, связывают с образованием производного пиридина, а интермедиатом этого процесса является иминиевый ион. В то же время лоперамид, тоже имеющий в своей структуре 4-пиперидинил и в результате метаболизма с участием цитохрома CYP3A4 образующий производное пиридина, не обладает нейротоксичностью [15]. Различия в профиле безопасности галоперидола и лоперамида подтверждают мнение о том, что не все соединения, подвергающиеся одинаковым механизмам биоактивации, вызывают аналогичные токсические эффекты. Вероятность производного вальпроевой кислоты подвергаться биоактивации с образованием ДНК-аддуктов и органоспецифичных токсичных метаболитов, в том числе нейротоксичных, следует учесть при проведении исследования фармакокинетики вещества.

Оценка вероятности проявления мутагенной активности в тесте Эймса с помощью программного

обеспечения QSAR Toolbox (v4.5 SP1) на уровне значимости 0,00412 позволяет предсказать отсутствие мутагенного действия производного вальпроевой кислоты с третичной аминогруппой в тесте Эймса на штаммах *S. typhimurium* TA 1535, TA 1537, TA 98, TA 100 и *E. coli* WP2 uvr A pKM 101 с метаболической активацией и без.

Данная оценка согласуется с результатами нашего исследования *in vitro*. Согласно им, вальпроевая кислота с третичной аминогруппой в концентрациях 0,02 мг/мл, 0,05 мг/мл, 0,16 мг/мл, 0,5 мг/мл, 1,58 мг/мл и 5,00 мг/мл не индуцировала мутации по типу сдвига рамки считывания (штаммы TA98 и TA1537 *S. typhimurium*) и замены пар оснований (штамм TA100, TA1535 *S. typhimurium* и wp2 uvrA и wp2 [pKM101] *E. coli*) в тесте Эймса без метаболической активации. Добавление в тестируемую систему метаболической фракции печени не повлияло на проявление генотоксической активности исследуемого вещества.

Интересно отметить цитотоксическое действие вальпроевой кислоты с третичной аминогруппой в концентрации выше 1,58 мг/мл на штаммы *S. typhimurium* TA 100 и *E. coli* WP2 uvr A pKM 101, как в тесте с метаболической активацией, так и без нее. С одной стороны, данный эффект может маскировать мутагенное действие высоких концентраций исследуемого вещества. С другой стороны, цитостатическое действие может быть обусловлено формированием ДНК-аддуктов, как следствие метаболической активации, с образованием AP-сайтов и межцепочечных поперечных связей в молекуле ДНК. Однако цитотоксическое действие производного вальпроевой кислоты с третичной аминогруппой показано и в тесте Эймса без метаболической активации, что противоречит данному утверждению.

ВЫВОДЫ

По результатам теста Эймса *in silico* и *in vitro* производное вальпроевой кислоты с третичной аминогруппой не обладает мутагенностью, данное фармакологически активное вещество можно рекомендовать для дальнейших доклинических исследований терапевтической эффективности и безопасности. При этом важно учесть, что цитотоксическое действие вальпроевой кислоты с третичной аминогруппой в отношении некоторых

бактериальных штаммов может маскировать его мутагенные свойства при высокой концентрации вещества. Учитывая цитотоксичность и возможное образование

ДНК-аддуктов, необходимо исследовать вероятные канцерогенные и цитотоксические эффекты в тестах на клетках млекопитающих и модельных экспериментах на животных.

Литература

1. Петров А. Н., Софронов Г. А., Нечипоренко С. П., Сомин И. Н. Антидоты фосфорорганических отравляющих веществ. Российский химический журнал. 2004; 48 (2): 110–116.
2. Marucci G, Buccioni M, Ben DD, Lambertucci C, Volpini R, Amenta F. Efficacy of acetylcholinesterase inhibitors in Alzheimer's disease. *Neuropharmacology*. 2021; 190: 108352. PubMed PMID: 33035532.
3. Birks JS, Grimley Evans J. Rivastigmine for Alzheimer's disease. *Cochrane Database Syst Rev*. 2015; 4: CD001191. PubMed PMID: 25858345.
4. Зорина В. Н., Евдокимова Е. А., Рейнюк В. Л. Методы профилактики и терапии судорожного синдрома при отравлении конвульсантами холинергического ряда. Медицина экстремальных ситуаций. 2022; (2): 14–21.
5. Connors NJ, Harnett ZH, Hoffman RS. Comparison of current recommended regimens of atropinization in organophosphate poisoning. *J Med Toxicol*. 2014; 10 (2): 143–7.
6. Беспалов А. Я., Прокопенко Л. И., Горчакова Т. Л., Петров А. Н., Зайцева М. А. и др., авторы; Федеральное государственное бюджетное учреждение науки «Институт токсикологии Федерального медико-биологического агентства», патентообладатель. Гидрохлорид (1-метилпиперидин-4-ил)-2-пропилпентаноата, обладающий холинолитической и противосудорожной активностью. Патент РФ № 2714135. 12.02.2020.
7. Мелехова А. С., Петров А. Н., Беспалов А. Я., Бельская А. В., Мельникова М. В., Зацепин Э. П. и др. Экспериментальная фармакотерапия судорожного синдрома при моделировании тяжелого отравления карбаматом. Медлайн.ру. 2019; 20: 294–306.
8. Snodin DJ. Genotoxic impurities: from structural alerts to qualification. *Organic process research and development*. 2010; 14 (4): 960–976.
9. Fukuchi J, Kitazawa A, Hirabayashi K, Honma M. A practice of expert review by read-across using QSAR Toolbox. *Mutagenesis*. 2019; 34 (1): 49–54.
10. Mortelmans K, Zeiger E. The Ames Salmonella/microsome mutagenicity assay. *Mutat Res*. 2000; 455 (1–2): 29–60. PubMed PMID: 11113466.
11. Heringa MB, Harmsen DJ, Beerendonk EF, Reus AA, Krul CA, Metz DH, et al. Formation and removal of genotoxic activity during UV/H(2)O(2)-GAC treatment of drinking water. *Water Res*. 2011; 45 (1): 366–374. PubMed PMID: 20828782.
12. Piegorsch WW, Simmons SJ, Margolin BH, Zeiger E, Gidrol XM, Gee P. Statistical modeling and analyses of a base-specific Salmonella mutagenicity assay. *Mutat Res*. 2000; 467 (1): 11–19. PubMed PMID: 10771267.
13. Benigni R. In silico assessment of genotoxicity. Combinations of sensitive structural alerts minimize false negative predictions for all genotoxicity endpoints and can single out chemicals for which experimentation can be avoided. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*. 2021; 126: 105042.
14. Ashby J, Tennant RW. Definitive relationships among chemical structure, carcinogenicity and mutagenicity for 301 chemicals tested by the U.S. NTP. *Mutat Res*. 1991; 257 (3): 229–306.
15. Kalgutkar AS, Gardner I, Obach RS, Shaffer CL, Callegari E, Henne KR, et al. A comprehensive listing of bioactivation pathways of organic functional groups. *Curr Drug Metab*. 2005; 6 (3): 161–225 PubMed PMID: 15975040.
16. Phillips DH, Arlt VM. Genotoxicity: damage to DNA and its consequences. *EXS*. 2009; 99: 87–110. PubMed PMID: 19157059.
1. Petrov AN, Sofronov GA, Nechiporenko SP, Somin IN. Antidoty fosfororganicheskikh otravlyayushchikh veshchestv. *Rossiyskiy khimicheskiy zhurnal*. 2004; 48 (2): 110–116. Russian.
2. Marucci G, Buccioni M, Ben DD, Lambertucci C, Volpini R, Amenta F. Efficacy of acetylcholinesterase inhibitors in Alzheimer's disease. *Neuropharmacology*. 2021; 190: 108352. PubMed PMID: 33035532.
3. Birks JS, Grimley Evans J. Rivastigmine for Alzheimer's disease. *Cochrane Database Syst Rev*. 2015; 4: CD001191. PubMed PMID: 25858345.
4. Zorina VN, Evdokimova EA, Reinyuk VL. Metody profilaktiki i terapii sudorozhnogo sindroma pri otravlenii konvul'santami kholinergicheskogo ryada. *Meditcina ekstremal'nykh situatsiy*. 2022; (2): 14–21. Russian.
5. Connors NJ, Harnett ZH, Hoffman RS. Comparison of current recommended regimens of atropinization in organophosphate poisoning. *J Med Toxicol*. 2014; 10 (2): 143–7.
6. Bespalov AY, Prokopenko LI, Gorchakova TL, Petrov AN, Zaytseva MA, i dr, avtory; Federal'noe gosudarstvennoe byudzhethnoe uchrezhdenie nauki «Institut toksikologii Federal'nogo mediko-biologicheskogo agentstva», patentoobladatel'. Gidrokhlord (1-metilpiperidin-4-il)-2-propilpentanoata, obladayushchiy kholinolicheskoy i protivosudorozhnoy aktivnost'yu. Patent RF № 2714135. 12.02.2020. Russian.
7. Melekhova AS, Petrov AN, Bespalov AY, Belskaya AV, Melnikova MV, Zatsepin EP, i dr. Eksperimental'naya farmakoterapiya sudorozhnogo sindroma pri modelirovanii tyazhelogo otravleniya karbamatom. *Medlayn.ru*. 2019; 20: 294–306. Russian.
8. Snodin DJ. Genotoxic impurities: from structural alerts to qualification. *Organic process research and development*. 2010; 14 (4): 960–976.
9. Fukuchi J, Kitazawa A, Hirabayashi K, Honma M. A practice of expert review by read-across using QSAR Toolbox. *Mutagenesis*. 2019; 34 (1): 49–54.
10. Mortelmans K, Zeiger E. The Ames Salmonella/microsome mutagenicity assay. *Mutat Res*. 2000; 455 (1–2): 29–60. PubMed PMID: 11113466.
11. Heringa MB, Harmsen DJ, Beerendonk EF, Reus AA, Krul CA, Metz DH, et al. Formation and removal of genotoxic activity during UV/H(2)O(2)-GAC treatment of drinking water. *Water Res*. 2011; 45 (1): 366–374. PubMed PMID: 20828782.
12. Piegorsch WW, Simmons SJ, Margolin BH, Zeiger E, Gidrol XM, Gee P. Statistical modeling and analyses of a base-specific Salmonella mutagenicity assay. *Mutat Res*. 2000; 467 (1): 11–19. PubMed PMID: 10771267.
13. Benigni R. In silico assessment of genotoxicity. Combinations of sensitive structural alerts minimize false negative predictions for all genotoxicity endpoints and can single out chemicals for which experimentation can be avoided. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*. 2021; 126: 105042.
14. Ashby J, Tennant RW. Definitive relationships among chemical structure, carcinogenicity and mutagenicity for 301 chemicals tested by the U.S. NTP. *Mutat Res*. 1991; 257 (3): 229–306.
15. Kalgutkar AS, Gardner I, Obach RS, Shaffer CL, Callegari E, Henne KR, et al. A comprehensive listing of bioactivation pathways of organic functional groups. *Curr Drug Metab*. 2005; 6 (3): 161–225 PubMed PMID: 15975040.
16. Phillips DH, Arlt VM. Genotoxicity: damage to DNA and its consequences. *EXS*. 2009; 99: 87–110. PubMed PMID: 19157059.