

ИССЛЕДОВАНИЕ ОСТРОЙ ТОКСИЧНОСТИ НОВОГО ВЕЩЕСТВА С ПРОТИВОВИРУСНОЙ АКТИВНОСТЬЮ

Л.И. Бугаева, Е.А. Лебедева

НИИ фармакологии ВолГМУ

В Волгоградском государственном медицинском университете проводятся исследования нового ряда соединений – производных 9-(2-феноксизтил)аденина. В ряду данных производных обнаружено вещество (ВМА-99-82) с противовирусной и антидепрессивной активностью [13, 4].

ЦЕЛЬ РАБОТЫ

Изучить профиль токсических свойств вещества ВМА-99-82 при однократном введении крысам.

МЕТОДИКА ИССЛЕДОВАНИЯ

Эксперименты проводили на 140 половозрелых крысах обоего пола массой 190–220 г, доставленных из питомника НИИГТиП г. Волгограда. Животные обеспечивались полноценными комбикормами, имели свободный доступ к автопоилкам и кормушкам. Содержались в пластиковых клетках по 5 особей одного пола. Освещение вивария в течение светового времени было естественным, температура воздуха поддерживалась на уровне 20–24 °С.

Весь комплекс исследований выполняли в три этапа. На первом этапе изучали острую токсичность, на втором исследовали влияние на функционально-поведенческий статус животных, на третьем рассчитывали терапевтический индекс, диапазоны безопасной и токсической активности.

При изучении острой токсичности субстанцию ВМА-99-82 вводили крысам с помощью металлического зонда внутрижелудочно в летальных дозах. Наблюдения вели в течение 15 дней. Отмечали клинику отравления и гибель крыс.

Расчет ЛД₅₀ вещества проводили с использованием метода Литчфилда и Уилкоксона [5].

На втором этапе оценку влияния вещества на "психо-неврологический" статус животных проводили по шкале Ирвина [3] по показателям: поведенческая активность (эмоциональность, настроенность, пассивность, агрессия, груминг, локомоции, стереотипии, спонтанная двигательная активность), нервно-рефлекторные (судороги, тремор, подергивания, реакция на болевые раздражители) и вегетотропные реакции (зрачковые рефлексы, урикации, дефекации, саливации, дыхание, температура тела, цвет кожи). На третьем этапе результаты тестирования подвергали математической обработке [2]. По отраженным интегральным значениям на круговой диаграмме рассчитывали терапевтический индекс, уровни безопасности (БМ) и субдоказания (ТУ) действия вещества.

На первом этапе исследований выявлено, что после введения вещества ВМА-99-82 крысам развитие признаков отравления наблюдалось в течение первого часа, продолжительность симптоматики интоксикации – в течение 4–6 ч, реабилитация физического состояния у животных, оставшихся в живых, наступала через сутки. Характерным для клиники отравления веществом являлось: понижение подвижности, вплоть до полной бездвиженности, седация, снижение тактильной и болевой чувствительности, птоз, одышка, бледность кожных покровов. Гибели крыс предшествовали: боковое положение, отсутствие реакций на болевые и внешние раздражители, угнетение дыхания, тремор конечностей, переходящий в отдельные тонические судороги. На вторые сутки наблюдений у животных, оставшихся в живых, были восстановлены все виды чувствительности. Впоследствии зафиксирована тенденция положительной динамики прироста массы тела, отдаленной гибели не отмечено.

При расчете выявлено, что ЛД₅₀ вещества в среднем равно 4811,66 мг/кг, что позволяет по классификации токсичности веществ [5] отнести ВМА-99-82 в класс малотоксичных.

На втором этапе исследований в профиле токсикологической активности вещества в дозах до 40 мг/кг, выявлено слабое влияние на функционально-поведенческий статус животных, отмечена тенденция увеличения частоты дыханий, реакций на раздражители, повышения (в среднем на 0,5 °С) ректальной температуры. Более существенными оказались эффекты вещества в диапазоне доз 75–300 мг/кг. При этом у крыс отмечено дозозависимое повышение настроенности, груминга, спонтанной двигательной активности, болевой и тактильной чувствительности, тонуса конечностей. Со стороны вегетативных эффектов наблюдалось: усиление дыхательной активности, прогрессирующее повышение ректальной температуры. У животных под действием вещества в дозе 300 мг/кг ректальная температура повышалась в среднем на 2–2,5 °С, а частота дыханий возросла в 2 раза. Иная динамика токсикологических эффектов прослеживалась у крыс под действием вещества в дозах от 600 до 4800 мг/кг. Отмечалось угнетение поведенческих реакций, нервно-мышечной возбудимости, ректальная температура понижалась в среднем на 1,5–2 °С, дыхание урежалось (до 5–10 актов в мин у крыс в дозе 4800 мг/кг). После математической обработки этих данных были получены интегральные значения, которые отразились в виде "дозовой траектории" на круговой диаграмме (см. рис. 1). Как видно из результатов, дозовая траектория вещества ВМА-99-82 охватывает все три сектора функционально-поведенческого статуса крыс. Характерные изломы на указанной траектории отражают в интегральном виде эффекты вещества на качественную основу состояния животных. Анализируя расположение дозовых точек на

интегральной траектории, предположили, что в диапазоне доз от 18,7 до 4800 мг/кг в действии вещества VMA-99-82 на психо-неврологический статус крыс прослеживаются четыре этапа. Этапы различной активности вещества отражены на интегральной "дозовой траектории" резко преломляющимися траекториями. Первый этап действия соответствует зонам точек I-II, второй – III-V, третий – VI-VII и четвертый – VIII-IX. При этом в первой и второй зонах отчетливо прослеживаются нарастающие дозозависимые интегральные эффекты. На "дозовой траектории" это точки 1-5 (соответственно дозы вещества от 18,7 до 300 мг/кг), расположенные по вертикали рядом. В данном плане влияние испытуемого вещества на психо-

неврологический статус крыс можно рассматривать как эффективное и безопасное. Третью зону активности вещества VMA-99-82 в диапазоне доз, расположенных на траектории в точках 5-7 (соответствует 300-1200 мг/кг), также можно отнести к диапазону безопасной активности вещества VMA-99-82. При этом у вещества безопасная фармакологическая (вероятно – терапевтическая) активность дозозависимо снижается за счет прогрессирующей динамики предикторов побочных эффектов, формирующих токсические свойства. Четвертая зона, соответствует токсическому диапазону активности вещества в дозах 2400 и 4800 мг/кг.

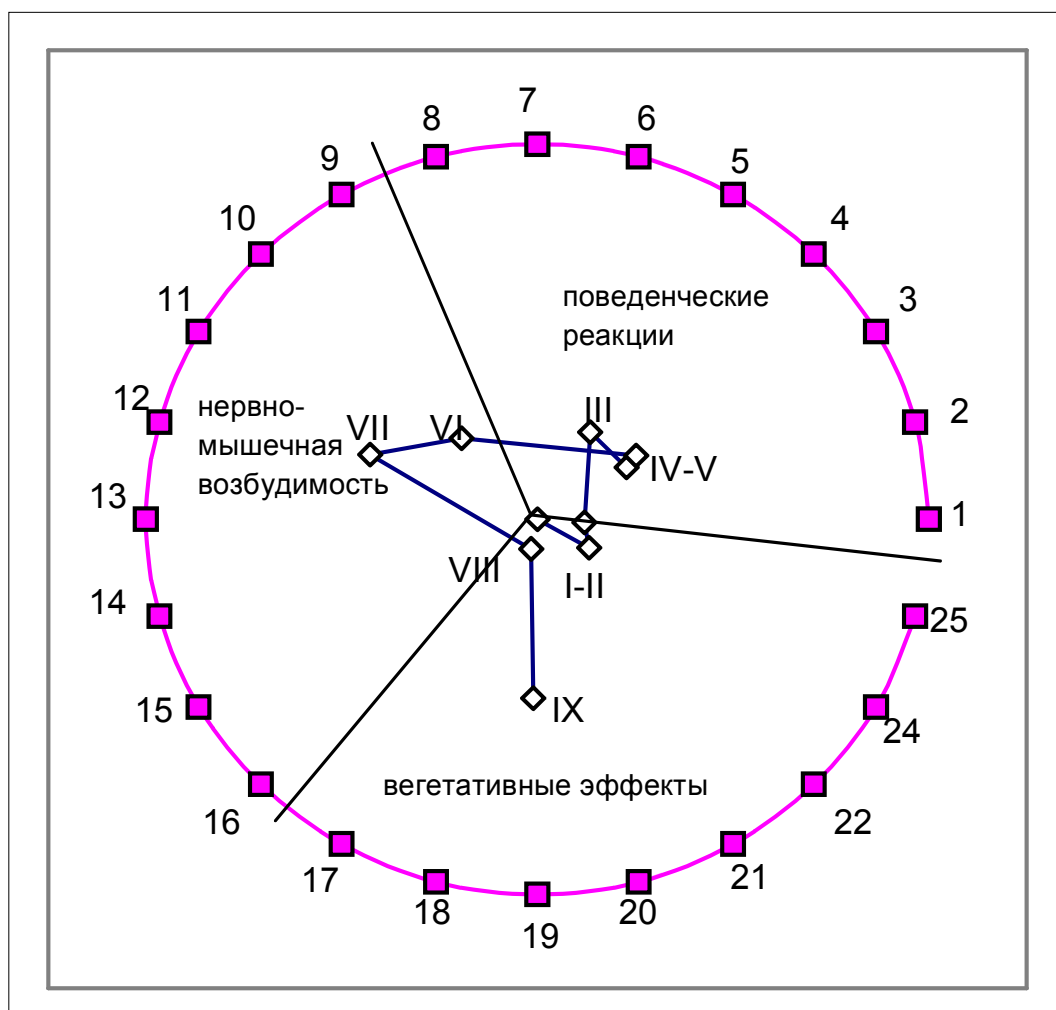


Рис. Интегральная оценка острого влияния вещества VMA-99-82 на функционально поведенческий статус крыс:

Римские цифры на "дозовой траектории" от I до IX соответствуют дозам вещества – 18,7; 37,5; 75,0; 150,0; 300,0; 600,0; 1200,0; 2400,0 и 4800,0 мг/кг; цифры на круговой диаграмме: 1 – вокализации, 2 – настороженность, 3 – пассивность, 4 – стереотипия, 5 – беспокойство, 6 – агрессия, 7 – груминг, 8 – спонтанная двигательная активность, 9 – реакция на прикосновение, 10 – реакции на боль, 11 – реакции на стук, 12 – тремор, 13 – подергивание, 14 – судороги, 15 – расстройство походки, 16 – тонус конечностей, 17 – положение мигательной перепонки, 18 – размер зрачка, 19 – саливации, 20 – урикации, 21 – дефекации, 22 – температура, 23 – цвет кожи, 24 – частота дыханий

Учитывая выделенные на "дозовой траектории" интервалы фармакологической и токсической активности вещества VMA-99-82, а также и величины ЛД₅₀, рассчитали терапевтический индекс (ТИ)

вещества, который оказался равным 257 у. е. В пределах данного интервала установили, что безопасный терапевтический потенциал вещества фиксируется на "дозовой траектории" в интервале от 18,7 до

300 мг/кг, что соответствует 16 у. е. В дальнейшем же предикторы побочных реакций нарастают, что сопряжено со снижением фармакологической эффективности вещества, но побочные эффекты вещества в диапазоне активности от 300 до 1200 мг/кг обратимы. Учитывая это, можно предположить, что вещество ВМА-99-82 безопасно в плане его энтерального введения крысам в дозах до 1200 мг/кг, а значит уровень его безопасного действия (диапазон точек 1–7 или от 18,7 до 1200 мг/кг) равен 64 у. е.

Токсическое действие у вещества прослеживается в дозах от 2400 до 4800 мг/кг. В данном диапазоне доз (8–9-е точки на интегральной "дозовой траектории") эффекты влияния вещества были необратимы, инвертированы диапазону активности 2 и 3, т. е. их можно расценивать как токсические (ТУ). При расчете ($TU = 4800/18,7$) установили, что достоверно токсический уровень вещества ВМА-99-82 оказался равным от 128 до 256 у. е.

Таким образом, по результатам проведенных исследований можно заключить, что по степени токсичности новое противовирусное средство относится к классу малотоксичных соединений. При этом установленные интегральным путем значения диапазонов терапевтического (16 у. е.) и токсического (256 у. е.) уровня действий отражают степень "пользы/риска" данного вещества и могут быть использованы в доклиническом обосновании критериев его безопасности.

ЛИТЕРАТУРА

1. Петров В.И., Озеров А.А., Новиков М.С. и др. // Химия гетероциклич. соед. – 2003. – Вып. 9. – С. 1389–1397.
2. Петров В.И., Озеров А.А., Новиков М.С. // Тез. II Съезда Рос. науч. общ. фармакол. – М., 2003. – Ч. 2. – С. 79.
3. Irvin S. // Animal and Clinical Pharmacologic Techniques in Drug Evaluation. – Chicago, 1964.
4. Бугаева Л.И., Веровский В.Е., Иежица И.Н. и др. // Эксп. клин. фармакол. – 2000. – Т. 63, № 1. – С. 3–6.
5. Бельский М.Л. Элементы количественной оценки фармакологического эффекта. – Л: Медгиз, 1961. – 152 с.

ПРОТИВОСТРЕССОРНЫЕ И ИММУНОМОДЕЛИРУЮЩИЕ СВОЙСТВА МАЛЫХ ДОЗ ВЫСОКОМОЛЕКУЛЯРНОГО ГЕПАРИНА

**М.В. Кондашевская, О.В. Макарова,
В.Л. Ковалева**

*ГУ НИИ морфологии человека РАМН,
Всероссийский научный центр биологически
активных веществ, г. Москва*

Эмоциональные стрессы, как сейчас бесспорно установлено, являются главной причиной иммунодефицитных состояний и повышения заболеваемости вирусными инфекциями. Для профилактики и лечения вирусных заболеваний следует включать препараты, оказывающие комплексное противовирусное, иммуномодулирующее и антистрессорное действие.

Мы предположили, что таким препаратом является высокомолекулярный гепарин (ВМГ), относящийся к классу гликозаминогликанов. ВМГ ингибирует инфицирование клеток многими разновидно-

стями вирусов, воздействуя на АТФ-азу и транскрипцию РНК в бактериальных клетках. Кроме того, ВМГ играет важную роль в воспалительных реакциях и иммунном ответе [5].

ЦЕЛЬ РАБОТЫ

Настоящее исследование направлено на экспериментальную проверку гипотезы о возможности влияния высокомолекулярного гепарина на психоэмоциональные, поведенческие, когнитивные (познавательные) характеристики и функциональную активность нейтрофилов периферической крови крыс Вистар при курсовом введении в дозе ниже терапевтической.

МЕТОДИКА ИССЛЕДОВАНИЯ

Эксперименты проведены на самцах крыс аутбредной линии Вистар с массой тела 250–280 г ($n = 90$), которых содержали в отдельных клетках группами по 10 особей. Опытная группа до обучения в многоальтернативном лабиринте получала ВМГ (фирма "Serva") в дозе 64 МЕ/кг (внутримышечно, 1 р/день, 5 сут.). Контролем служили интактные животные (ИК) и крысы, которым вводили 0,3 мл 0,9% физиологического раствора (ФР).

Для исследований функциональной активности нейтрофилов приготавливали мазки периферической крови, которые окрашивали по В.Е. Пигаревскому с соавт. [2]. Содержание лизосомально-катионных белков определяли полуколичественным методом, вычисляя средний цитохимический коэффициент.

Информационный стресс создавали в модельных условиях обучения в многоальтернативном лабиринте, где животные должны были по методике свободного выбора (без вмешательства экспериментатора) найти правило многократного получения пищи в течение опыта: после взятия пищи (семечки подсолнуха) в одной или двух кормушках из четырех, имеющихся в лабиринте, животные должны были самопроизвольно покинуть пищевую среду – выйти в свободное поле (не пищевую среду), для того чтобы, вновь зайдя в лабиринт, иметь возможность получить новую порцию корма в тех же кормушках. Регистрировали локомоторную активность, число заходов в лабиринт, количество подкреплений и ошибок, совершенных за опыт. Анализ психоэмоционального состояния крыс во время процесса обучения производили на основании подсчета безусловных реакций, которые затем подразделяли на активные и пассивные классы. Подробное описание поведенческой модели описано в ряде публикаций (Никольская К.А. с соавт., 1998). Обучение проводили ежедневно в течение 20 дней.

Регистрация и первичный анализ данных осуществлялись с помощью компьютерной программы "Labyrinth" [1]. Статистическая обработка полученных результатов проводилась с помощью статистического пакета "STATGRAF" для Windows 6.0. и "ANOVA", достоверность значений оценивали по критерию Колмогорова–Смирнова и t -критерию