

ИЗУЧЕНИЕ УРОВНЯ БЕЗВРЕДНОСТИ НОВОГО ПРОИЗВОДНОГО АДЕНИНА, ПРОЯВЛЯЮЩЕГО АНТИДЕПРЕССИВНУЮ АКТИВНОСТЬ ПРИ ОДНОКРАТНОМ ВВЕДЕНИИ В МАКСИМАЛЬНЫХ ДОЗАХ

Д. Г. Ковалев, Л. И. Бугаева, А. А. Озеров

Научно-исследовательский институт фармакологии ВолГМУ

В рамках дальнейшего изучения фармакологических свойств и определения широты диапазона безопасного действия нового вещества была исследована острая токсичность ВМА-99-82. В данной работе приведены результаты изучения острой токсичности и определения параметров LD_{50} соединения ВМА-99-82 (9-[2-(4-изопропилфенокси) этил]аденин) при энтеральном и парентеральном (внутрибрюшинно, внутримышечно, подкожно) путях введения крысам.

Ключевые слова: острая токсичность, величина токсичности, морфологические изменения, крысы.

STUDYING THE EXTENT OF SAFETY OF A NEW ADENINE DERIVATIVE SHOWING ANTIDEPRESSIVE ACTIVITY UPON SINGLE INTRODUCTION IN MAXIMUM DOSES

D. G. Kovalev, L. I. Bugaeva, A. A. Ozerov

Acute toxicity VMA-99-82 was investigated in the context of further study of pharmacological properties and definition of the range of safety of a new substance. The paper presents the results of studying acute toxicity and defining LD_{50} parameters of VMA-99-82 (9 [2 (4-isopropylphenoxy) ethyl] adenine) compound upon intraperitoneal and parenteral (intramuscular, hypodermic) administration to rats.

Key words: acute toxicity, toxicity extent, morphological changes, rats.

Поиск новых высокоэффективных препаратов для лечения ВИЧ-1 и оппортунистических вирусных инфекций по-прежнему остается одной из самых актуальных задач современной фармакологии. Одним из наиболее перспективных направлений является поиск селективных нуклеозидных ингибиторов цитомегаловирусной ДНК-полимеразы [4, 5]. В течение последних 10 лет подобные соединения синтезируются и исследуются в Научно-исследовательском институте фармакологии Волгоградского медицинского университета, в результате чего был открыт новый класс антицитомегаловирусных агентов, демонстрирующих активность *in vitro* в наномолярном диапазоне [3].

В дальнейшем, в результате углубленных доклинических исследований, было показано, что 9-[2-(4-изопропилфенокси)этил]аденин, под лабораторным шифром ВМА-99-82, сочетает выраженные вирус-ингибиторные свойства с антидепрессивной активностью [1].

В рамках дальнейшего изучения фармакологических свойств и определения широты диапазона безопасного действия нового вещества была исследована острая токсичность ВМА-99-82.

ЦЕЛЬ РАБОТЫ

Изучение острой токсичности и определение параметров LD_{50} соединения ВМА-99-82 (9-[2-(4-изопропилфенокси)этил]аденин) при энтеральном (внутрижелудочно) и парентеральном (внутрибрюшинно, внутримышечно, подкожно) путях введения крысам.

МЕТОДИКА ИССЛЕДОВАНИЯ

Эксперименты проводились на 200 половозрелых крысах обоего пола, массой 200—250 г. Проведение всех экспериментов над животными руководствуется

базисными, нормативными Рекомендациями Комитета по экспериментальной работе с использованием животных при Минздравсоцразвития России, Рекомендациями Всемирной организации здравоохранения, «Международными рекомендациями по проведению медико-биологических исследований с использованием животных (1985)», а также согласно ГОСТ 3 51000.3-96 и ГОСТ 3 5100.4-96, правилами GLP. Приказом МЗ РФ № 267 от 19.06.2003 г. «Об утверждении правил лабораторной практики РФ», а также с разрешения Регионального независимого этического комитета Волгоградского научного центра Российской академии медицинских наук и Администрации Волгоградской области.

Для проведения экспериментов по определению LD_{50} порции навесок субстанции ВМА-99-82, соответствующие массе испытуемого животного, помещали в 50%-й раствор диметилсульфоксида (ДМСО). Полученная взвесь ВМА-99-82 использовалась после охлаждения (до температуры тела) для введения крысам внутривенно, а также внутрибрюшинно и подкожно. Контрольным животным, в эквивалентных объемах, вводили растворитель (50%-й раствор ДМСО). При этом в первые сутки эксперимента в течение 5—7 часов наблюдения велись непрерывно. Отмечали клинику отравления, летальные исходы, признаки реабилитации. В последующие сутки наблюдений у крыс отмечали общее состояние, зоосоциальность, пищевую активность, массу тела, фиксировали летальность. Затем животных подвергали эвтаназии (под эфирным наркозом), соблюдая рекомендации международной конвенции по умерщвлению животных. На вскрытии у крыс проводили макроскопический обзор внутренних органов, которые в последующем отсекались и помещались в физиологический раствор.

Далее изготавливали парафиновые блоки, из которых на санном микротоме (МС-2) получали срезы тканей органов толщиной 3—5 мкм, которые фиксировали на предметном стекле. После окраски срезов гематоксилин-эозином проводили микроскопические исследования [2].

Статистическую обработку результатов исследования проводили на компьютере в программе Microsoft Excel.

Расчет величин токсичности (LD_{16} , LD_{50} , LD_{84}) у вещества ВМА-99-82 проводили по стандартному классическому методу Литчфилда и Уилкоксона (версия 1.03;18.10.93).

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Общие сведения. По результатам исследований изучения острой токсичности ВМА-99-82 на крысах установлены характерные признаки острого отравления веществом, рассчитаны границы токсичности при энтеральном и парентеральном способах введения. В клинике отравления и рассчитанных границах LD_{50} межполовых существенных различий не обнаружено. Кроме того, не выявлено также и существенных различий в динамике проявлений клиники токсических эффектов у крыс, зависящих от пути введения испытуемого вещества. Признаки интоксикации у крыс были типичны как при внутрижелудочном, так и при внутрибрюшинном и подкожном способах введения ВМА-99-82. Их выраженность и продолжительность зависели от испытуемой дозы вещества.

Латентный период и клиника отравления. Временной интервал развития клиники отравления у крыс под действием токсических и летальных доз вещества ВМА-99-82 был непродолжительным, в среднем от 5 до 15 мин. Случаи летальных исходов у крыс наблюдались в течение 60—120 мин. Симптоматика признаков отравления у животных прослеживалась в дальнейшем еще на протяжении 4—6 часов. Реабилитация физической и поведенческой активностей наступала через 10—12 часов. Отдаленной гибели не наблюдалось. Кожные покровы и состояние слизистых были практически не изменены относительно контроля.

В динамике развития клиники отравления веществом ВМА-99-82 прослеживалась поэтапность. Первоначально, первые 10—12 мин после введения вещества у крыс наблюдалась слабая седация, которая сочеталась с понижением подвижности. При этом также фиксировалось незначительное увеличение частоты дыхательных движений. Тактильная и болевая же чувствительности у испытуемых животных были на уровне исходных величин. По истечении указанного времени у крыс наблюдалось углубление седации, угнетение подвижности, вплоть до полной обездвиженности, снижение тактильной и болевой чувствительности, птоз, одышка, бледность кожных покровов. У животных с летальными исходами, непосредственно перед их гибелью, отсутствовали рефлекторные ответы на внешние воздействия. Впоследствии у оставшихся в живых крыс восстанавливалось дыхание, чувствительность, розовели кожные покровы.

Динамика реабилитации. На вторые сутки наблюдений оставшиеся в живых животные были активными. До уровня контрольных значений у данных животных были восстановлены тактильная и болевая чувствительности. Гибели на вторые сутки и в более отдаленные сроки наблюдений не обнаружено. По результатам двухнедельных исследований (осмотр, взвешивание) у животных, получавших соединение ВМА-99-82 в дозах, близких к LD_{50} — LD_{16} , установлена положительная динамика прироста массы тела, при этом общее состояние животных, их шерстный покров и состояние слизистых практически не отличались от состояния контрольных крыс. В группах крыс, которым указанное вещество вводили в дозах, близких LD_{50} — LD_{100} , прирост массы тела оказался ниже относительно контрольных значений в среднем на 20—25 %. Кроме того, общее состояние у этих животных, в сравнении с контролем, было менее опрятным. Наблюдалось снижение подвижности, незначительная седация.

Расчет границ токсичности. Результаты расчета LD_{50} , LD_{16} и LD_{84} отражены в табл. 1, 2.

Таблица 1

Параметры острой токсичности (LD_{50} , мг/кг) субстанции вещества ВМА-99-82 при различных путях введения крысам

Путь введения	Крысы-самцы	Крысы-самки
Внутрижелудочно	4811,66 (4436,6—5166,19)	4811,66 (4436,6—5166,19)
Внутрибрюшинно	3957,85 (2982,1—4,846,11)	3957,85 (2982,1—4,846,11)
Подкожно	4345,20 (3497—5075,34)	4345,20 (3497—5075,34)

Таблица 2

Динамика массы тела крыс, однократно получавших субстанцию вещества ВМА-99-82 в дозах, близких к LD_{50} ($M \pm m$)

Способ введения	Пол крыс	Масса тела крыс, г			Прирост, %
		исходно	через 7 дней	через 14 дней	
Контроль (50 % ДМСО)	Самцы	230,00 ± 11,55	235,00 ± 14,43	242,5 ± 7,5	5,2
	Самки	202,50 ± 10,31	212,00 ± 7,02	219,20 ± 9,57	8,4
Внутрибрюшинно	Самцы	235,00 ± 2,89	238,50 ± 4,79	240,00 ± 4,08	2,2
	Самки	196,50 ± 8,66	197,5 ± 2,5	202,5 ± 2,5	3,1
Подкожно	Самцы	234,00 ± 3,35	230,0 ± 4,5	238,0 ± 8,5	1,7
	Самки	205,0 ± 4,8	202,30 ± 2,16	209,00 ± 4,74	1,9
Внутрижелудочно	Самцы	235,00 ± 2,89	220,0 ± 6,2	236,5 ± 6,5	0,6
	Самки	206,2 ± 8,0	197,5 ± 2,5	208,00 ± 4,08	0,9

Из представленных данных видно, что исследуемое вещество, независимо от пути введения животным, обладало низкой токсичностью.

При этом необходимо также отметить, что на вскрытии погибших от летальных доз ВМА-99-82 крыс (независимо от пути введения) не обнаружено наличия испытуемой субстанции ни в брюшине, ни в желудочно-кишечном тракте и спинной подкожной складке, что свидетельствует о полной его всасываемости с места введения в кровь.

Микроскопические исследования. По результатам морфологических исследований внутренних органов крыс, получавших в острых экспериментах вещество ВМА-99-82, установлено, что в тканях *головного мозга* послойное строение и структура не нарушены. Вместе с тем в исследуемых препаратах выявлено отчетливое полнокровие сосудов головного мозга и в отдельных клетках дистрофические изменения.

На препаратах тканей *сердца* также обнаружено сохранение структуры органа. Кардиомиоциты были удлиненной формы и обычных размеров. При этом в венах и межмышечных капиллярах отмечалось выраженное кровенаполнение, а в стенках сосудов миокарда мукоидное набухание. В *легких* — структура органа сохранена, ткань воздушная. Выявлено отчетливое полнокровие в легочных венах и межальвеолярных капиллярах. При микроскопическом исследовании тканей *селезенки* в органе отмечается полнокровие и наличие гемосидерофагов как в красной пульпе, так и в сосудах. В препаратах тканей *почек* структура органа не изменена. Выявлено полнокровие в капиллярах клубочков. В почечных канальцах прослеживается набухание нефротелия, лизис отдельных ядер клеток канальцев. Структура тканей *печени*, печеночных балок сохранена. При этом отчетливо фиксируется выраженное полнокровие вен органа. Прослеживается мелко-капельная дистрофия гепатоцитов с лизисом ядер и клеточных мембран отдельных гепатоцитов. В клетках Купфера и сосудах печени встречается в большом количестве темный пигмент. В *надпочечниках* крыс соотношение зон коркового слоя сохранено, в клубочковой и пучковой зонах коркового вещества выявлено просветление цитоплазмы, что в какой-то степени может свидетельствовать о повышенном выбросе гормонов (например, альдостерона). Сосуды надпочечника полнокровны. Без изменений оказались ткани *желудочно-кишечного тракта* (желудок и отделы 12-перстной кишки, тонкого и толстого кишечника), *гонад*.

Таким образом, при морфологическом исследовании внутренних органов и головного мозга крыс, получавших вещество ВМА-99-82 в токсических дозах, не выявлено грубых структурных нарушений. В исследуемых органах фиксировалась типичная картина острого токсического лекарственного стресса.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

С учетом классификации токсичности веществ по Саноцкому И. В. и Улановой И. П. исследованное соединение ВМА-99-82, 9-[2-(4-изопропилфенокси)этил]-аденин относится к классу низкотоксичных.

Характерные признаки отравления веществом ВМА-99-82 фиксировались у крыс независимо от способа введения в течение первых трех часов эксперимента. Летальные исходы у животных от токсических доз соединения ВМА-99-82 фиксировались в этот же промежуток времени. Гибели животных в более отдаленные сроки не отмечается.

По результатам гистологических исследований внутренних органов крыс, однократно получавших токсические дозы вещества ВМА-99-82, выявлены предполагаемые «органы-мишени»: головной мозг, печень и почки.

ЛИТЕРАТУРА

1. Ананьева О. Ю. Антидепрессивная активность и аспекты механизма действия новых производных 9-(арилоксиэтил)аденина: Автореф. дис. ... канд. мед. наук. — Волгоград, 2005. — 26 с.
2. Кузубова Е. А., Спасов А. А., Бугаева Л. И., Букатин М. В. // Экспериментальная и клиническая фармакология. — 2007. — Т. 70, № 1. — С. 37—39.
3. Петров В. И., Озеров А. А., Новиков М. С. и др. // Бюлл. ВНЦ РАМН и АВО. — Волгоград, 2006. — № 1. — С. 15—16.
4. Chan L., Stefanac T., Lavallée J., et al. // Bioorg. Med. Chem. Lett. — 2001. — Vol. 11, № 2. — P. 103—105.
5. Slater M. J., Baxter R., Bonser R. W., et al. // Bioorg. Med. Chem. Lett. — 2001. — Vol. 11, № 15. — P. 1993—1995.

Контактная информация:

Озеров Александр Александрович — д. х. н., профессор, заведующий кафедрой фармацевтической и токсикологической химии, зам. директора по научной работе НИИ фармакологии ВолГМУ, e-mail: ozerov@vlink.ru