

## 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  $LD_0$ — $LD_{16}$ , 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 Санцокому 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