

ИЗУЧЕНИЕ ТОКСИЧЕСКИХ СВОЙСТВ РУ-185 (ЭНОКСИФОЛ) ПРИ ОДНОКРАТНОМ ВВЕДЕНИИ КРЫСАМ

Л. И. Бугаева, Е. А. Кузубова, Д. Н. Реброва, М. В. Букатин, А. А. Спасов

*Волгоградский государственный медицинский университет,
кафедра фармакологии, кафедра биологии, кафедра фундаментальной медицины и биологии,
НИИ фармакологии ВолгГМУ*

В экспериментах на крысах при внутрижелудочном введении вещества РУ-185 в токсических дозах установлено, что границы LD_{50} составляют для крыс-самцов 1920,96 (1858,47÷1985,55) мг/кг, для крыс-самок — 2260,3 (2294,69÷2226,39) мг/кг. С учетом классификации токсичности по ГОСТу 12.1.007-76 можно отнести данное вещество к классу умереннотоксичных. При оценке влияния РУ-185 на функционально-поведенческий статус крыс обнаружено, что его минимальная фармакологическая активность проявляется в дозе 1,9 мг/кг, а максимальная — в дозах от 59 мг/кг до 119 мг/кг. С учетом LD_{50} и диапазонов фармакологической активности рассчитано, что широта терапевтического индекса эноксифола равна 1000 у. е., а в пределах данной широты, диапазон его безопасной фармакологической активности равен 240 у. е.; тогда как диапазон токсической активности составляет 475—1000 у. е. Сведения о выявленных уровнях токсичности вещества РУ-185 (эноксифол) и диапазонах его фармакологической и токсической активностей целесообразно использовать для выбора доз в последующих доклинических токсикологических исследованиях.

Ключевые слова: производные бензимидазола, РУ-185 (эноксифол), острая токсичность, границы LD_{50} , функционально-поведенческий статус крыс.

SINGLE-DOSE TOXICITY STUDY OF RU-185 (ENOXIFOL) IN RATS

L. I. Bugaeva, E. A. Kuzubova, D. N. Rebrova, M. V. Bukatin, A. A. Spasov

*Volgograd State Medical University,
Department of Pharmacology, Biology Department, Department of Fundamental Medicine and Biology,
Institute of Pharmacology of VolgSMU*

LD_{50} values were 1920.96 mg/kg (1858.47÷1985.55 mg/kg) for male rats and 2260.3 (2294.69÷2226.39) mg/kg for female rats after intragastric administration of toxic doses of RU -185. Based on classification criteria for acute toxicity (GOST 12.1.007-76), we allocated this substance to a moderately toxic drug category. We evaluated functional and behavioral effects of RU-185 on rats and established that its minimum pharmacological activity was observed at a dose of 1.9 mg/kg, while the maximum — at a dose of 59—119 mg/kg. Taking into account the LD_{50} values and the range of pharmacological activity recorded for RU-185, we calculated the therapeutic index of enoxifol and it equaled 1000. Within the given therapeutic index, the range of pharmacological activity that is safe equals 240, while the range of toxic activity equals 475—1000. We suggest that the data on enoxifol toxicity and the ranges of its pharmacological and toxic activities could be used for dose selection/adjustment in subsequent preclinical toxicity studies.

Key words: benzimidazole derivatives, RU-185 (enoxifol), acute toxicity, LD_{50} limit values, functional and behavioral characteristics of rats.

В настоящее время поиск новых эффективных и безопасных лекарственных средств является актуальной задачей. В этом отношении обращают на себя внимание исследования, проведенные в Волгоградском государственном медицинском университете на ряде высокоактивных конденсированных производных бензимидазола [8], среди которых обнаружено новое вещество РУ-185 (эноксифол) с антиоксидантной активностью, не уступающей препарату мексидол [7], и сопутствующим широким спектром биологической активности [3, 4, 12].

ЦЕЛЬ РАБОТЫ

В данном исследовании сочли целесообразным определить у вещества РУ-185 (эноксифол) уровни токсичности и изучить влияние на функционально-поведенческий статус крыс при однократном интрагастральном введении в дозах, убывающих от LD_{50} .

МЕТОДИКА ИССЛЕДОВАНИЯ

Эксперименты проводились на 120 конвенциональных белых крысах обоего пола, 3,5—4-месячного возраста, массой 250—280 г, полученных из питомника ФКУЗ «Волгоградский научно-исследовательский противочумный институт» Роспотребнадзора и прошедших 2-недельный карантин в виварии НИИ фармакологии ВолгГМУ. Содержание животных соответствовало принципам надлежащей лабораторной практики (ГОСТ Р-53434-2009), 2010. [9].

В дизайне исследований придерживались комплексного методического подхода, предусматривающего поэтапное изучение острой токсичности, влияния исследуемого вещества на функционально-поведенческий статус животных, расчета у него диапазонов безопасного и токсического уровней действий [2, 5, 10].

Изучение острой токсичности проводили с учетом методических рекомендаций по проведению доклинических исследований лекарственных средств методом

Litchfield and Wilcoxon [6]. Субстанцию вещества РУ-185 растворяли на дистиллированной воде и вводили опытным группам крыс внутрижелудочно металлическим зондом однократно в токсических дозах: 1400,0; 1600,0; 1800,0; 2000,0; 2200,0; 2400,0 мг/кг. Контрольной группе крыс вводили внутрижелудочно дистиллированную воду в объеме 5 мл/кг, что соответствует объему растворенной субстанции при введении опытным животным. Наблюдения за опытными и контрольными крысами вели в течение 2 недель. При этом в первые сутки наблюдения вели непрерывно в течение 8 час, а в последующие сутки — периодически утром и вечером. Отмечали клинику развития токсических эффектов и ее реабилитацию, подсчитывали количество погибших и выживших животных. По результатам гибели рассчитывали границы среднесмертельных доз (LD_{50}) вещества.

Влияние вещества РУ-185 на функционально-поведенческий статус животных проводили по методу S. Irwin, 1964 [11]. Результаты данных исследований, с использованием методического подхода Л.И. Бугаевой и соавт. [2], после математической обработки являлись основой для расчета широты терапевтического индекса (ШТИ) вещества и определения диапазонов безопасного (ДБА) и токсического (ДТА) действия в границах ШТИ.

Влияние вещества РУ-185 на функционально-поведенческий статус крыс оценивали по спектру: поведенческих реакций (настороженность, пассивность, агрессия, беспокойство, груминг, спонтанная двигательная активность), нервно-мышечных (судороги, парезы, тремор, реакции на раздражители) и вегетативных эффектов (размеры и реакции зрачка, птоз, уринация, дефекация, саливация, цвет кожи, частота дыхания, ректальная температура), с использованием 8-балльной шкалы Ирвина. Состояние животных в норме приравнивалось к 4 баллам, а изменение параметра в среднем на 25 % соответствовало изменению в 1 балл. Возрастание внешне наблюдаемых изменений по шкале от 4 до 8 баллов указывало на увеличение эффекта, а снижение — от 4 до 0 баллов. В данных исследованиях вещество РУ-185 начинали вводить крысам внутрижелудочно, в усредненных дозах, убывающих от LD_{50} до минимальной дозы, проявляющей фармакологический эффект: 1900,0; 950,0; 475,0; 238,0; 119,0; 59,0; 30,0; 15,0; 3,8; 1,9 мг/кг. Контрольной группе животным вводили дистиллированную воду в объеме 5 мл/кг. Результаты данных исследований в последующем подвергли математической обработке (с использованием пакета программ Excel и Statistica 6.0). После математической обработки результаты тестирования в интегральном виде отражались на круговой диаграмме в форме «дозовой траектории». По «дозовой траектории» у препарата определяли диапазоны безопасной и токсической активностей. Широту терапевтического индекса рассчитывали по отношению дозы LD_{50} к минимальной дозе, вызывающей фармакологический эффект, диапазон безопасного действия (ДБА) рассчитывали по соотношению максимальной эффективной

безопасной дозы к минимальной дозе, вызывающей фармакологический эффект, диапазон токсического действия (ДТА) — от минимальной токсической дозы до дозы LD_{50} .

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

По результатам изучения острой токсичности выявлено, что гибель животных после введения субстанции вещества РУ-185 (эноксифол) в токсических дозах наблюдалась в течение первых 2 часов. Для клиники отравления веществом было характерно угнетение подвижности, прогрессирующая седация и адинамия с изоляцией в углу камеры и принятия сидячего положения с симптомом «поникшей головы», бледность кожных покровов, снижение реакций на болевые и тактильные раздражители. При нарастании токсических эффектов, предшествующих гибели животных, прослеживалось угнетение дыхания, акроцианоз, боковое положение, тонические судороги, переходящие в клонико-тонические. Животные, оставшиеся в живых, пребывали в боковом положении еще на протяжении 40—60 мин. Впоследствии у них отмечалась характерная для первых суток реабилитационная динамика — активизировалось дыхание, снижалась интенсивность акроцианоза, из бокового положения животные переходили в положение лежа на животе. На вторые сутки наблюдений подвижность животных была снижена, реакции на внешние и болевые раздражители также были угнетены. При этом отмечалась неопрятность и тусклость шерстного покрова. Указанная динамика с постепенным восстановлением до контрольного состояния наблюдалась у этих животных в течение 8—9 суток эксперимента. Отдаленной гибели у животных не наблюдалось.

Проведенные расчеты границы среднесмертельной дозы позволили обнаружить, что уровень LD_{50} вещества РУ-185 оказался равным: 1921,0 (1858,5÷1985,6) мг/кг для крыс-самцов и 2260,3 (2294,7÷2226,4) мг/кг для крыс-самок.

Учитывая полученные результаты и ориентируясь на классификацию токсичности ГОСТ 12.1.007-76 и ГОСТ 17.4.1.02-83 [1] вещество РУ-185 можно отнести к классу умереннотоксичных. Для последующей оценки широты фармакотоксикологических свойств вещества РУ-185 и определения диапазонов доз безопасного и токсического действия сочли целесообразным изучить его влияние на функционально-поведенческий статус животных. Для этой цели вещество РУ-185 вводили в дробно-убывающей дозе от LD_{50} до дозы, проявляющей минимальный фармакологический эффект.

Результаты исследований отражены в табл. Из представленных данных видно, что в спектре поведенческих реакций у крыс под действием эноксифола практически не зависимо от его дозы отчетливо снижалась в среднем на 2—3 балла спонтанная двигательная активность. Другие поведенческие реакции изменялись менее существенно. Прослеживались некоторые

Влияние вещества эноксифол (*per os*) на функционально-поведенческий статус крыс

Тестируемые параметры, баллы	Норма	Дозы, мг/кг										
		1,9	3,8	15	30	59	119	238	475	950	1900	
<i>Поведенческие реакции</i>												
Вокализация	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Настороженность	4	4	4	4	4	4	4	4	4	3	2	1
Активность	4	3,5	3,5	3,5	4	4	4	4	4	3	3	1
Стереотипия	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Беспокойство	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Агрессия	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Груминг	4	4	4	5	5	5	4,5	4	4	4	3	1
Спонтанная двигательная активность	4	1	1	1	2	2	3	3	3	2	1	1
<i>Нервно-мышечная возбудимость</i>												
Реакция на прикосн.	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	3	2
Реакция на боль	4	3	3	3	3	3	3	3	3	2	2	2
Реакция на стук	4	3	3	3	3	3	3	3	3	3	2	2
Тремор	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Подергивание	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Судороги	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Расстройство походки	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1	2	2
Тонус конечностей	4	4	4	4	3	3	2	2	2	2	2	2
<i>Вегетативные эффекты</i>												
Положение мигательной перепонки	4	4	4	3,5	3,5	3	3	3	3	3	2	2
Размер зрачка	4	5	4	4	3	3	3	3	3	2	2	2
Саливация	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Уринация	4	7	7	7	7	7	7	7	7	6	5	5
Дефекация	4	4	4	4	4	4	4	4	4	5	5	5
Температура (<i>per rectum</i>)	4	4	3	3	3	2	2,5	4,2	4,5	4,5	4	3,5
Цвет кожи	4	4	4	3	3	3	3	4	4	5	3,5	2,5
Частота дыхания	4	6	6	5	3,5	3	3	3,5	3	3	3	2,5

Примечание. Спектр внешне наблюдаемых изменений, вызываемый веществами, выражен количественно по восьмibalльной шкале: возрастание по шкале от 4 до 8 баллов указывает на увеличение эффекта, а снижение — от 4 до 0 — на угнетение (где 4 балла — оценка параметра в норме, а изменение в 1 балл соответствует изменению параметра в среднем на 25 %). В шкале оценок токсического профиля препарата, для признаков в норме отсутствующих или в незначительной степени имеющих место, активность выражается в значениях шкалы от 0 до 8 баллов (где 0 баллов — отсутствие признаков интоксикации).

вариации изменений груминга, который повышался в среднем на 1 балл у крыс в диапазоне доз от 15 мг/кг до 119 мг/кг, но затем снижался в среднем на 2—3 балла при введении вещества в диапазоне доз от 950 до 1900 мг/кг. Также в диапазоне доз от 475 мг/кг до 1900 мг/кг снижались настороженность и активность от 1 до 3 баллов. Стереотипии и агрессии у данных животных не прослеживалось.

В спектре нервно-мышечной возбудимости у животных фиксировалось дозозависимое снижение реакции на болевые и слуховые раздражители на 1—2 балла. При этом тремора конечностей, подергиваний и наличия судорог в исследуемых дозах у крыс не наблюдалось. Наряду с этим в диапазоне доз от 59 мг/кг до 1900 мг/кг у крыс прослеживалось постепенное снижение тонуса конечностей в среднем на 1—2 балла и изменения в координации передвижений. Со стороны вегетативных эффектов у животных отмечалось дозозависимое снижение реакции зрачка, наличие птоза и повышение уринаций на 2—3 балла. Одновременно, у опытных крыс прослеживалось нарушение частоты дыхания, которое повышалось при введении вещества в диапазоне доз

от 1,9 мг/кг до 15 мг/кг на 1—2 балла, но при увеличении вводимых доз, наоборот, постепенно дозозависимо угнеталось на 1—2,5 балла. При этом ректальная температура у крыс под действием вещества в диапазоне доз от 3,8 мг/кг до 119 мг/кг также несколько снижалась.

В последующем, полученные данные подвергались математической обработке, по результатам которой была получена круговая диаграмма (рис.) функционально-поведенческого статуса животных, а эффекты вещества на этой диаграмме были отражены в форме интегральной «дозовой траектории». При этом в зависимости от дозы «дозовая траектория» проходила по секторам спектра поведенческих и вегетативных реакций, практически не задев сектор нервно-мышечных реакций. Анализируя данную траекторию эффектов, у вещества РУ-185 отметили несколько уровней активности. На первом уровне активности у эноксифола, ограниченном на графике точками I—III (соответствует дозовому диапазону от 1,9 мг/кг до 15,0 мг/кг), вероятно, преобладают вегетативные эффекты, в которых ведущим звеном являются изменения температуры

и дыхания. По мере увеличения дозы вещества данные эффекты нивелируются за счет нарастания поведенческих реакций. Другие эффекты вещества в указанных дозах являлись сопутствующим и на втором уровне активности эффекты, отраженные на интегральной «дозовой траектории», ограничены точками от IV до VII, что соответствует дозам от 30,0 мг/кг до 238,0 мг/кг, превалирует поведенческий спектр, в котором ведущим звеном являются спонтанная двигательная активность и груминг. При этом указанная активность у вещества в дозах от 30,0 мг/кг до 119,0 мг/кг приблизительно одинакова и максимальна; на третьем уровне эффекты вещества формируются на «дозовой траектории» в диапазоне точек VIII до IX (дозы вещества от 475 мг/кг до 1900 мг/кг), где постепенно начинали нарастать вновь вегетотропные эффекты, что на фоне угнетения поведенческих реакций, вероятно, может свидетельствовать о развитии под действием эноксифола токсикотропной динамики, в последующем приводящей к летальным исходам.

Дозы препарата (мг/кг):

- I — 1,9
- II — 3,8—7,6
- III — 15,0
- IV — 30,0
- V — 59,0
- VI — 119,0
- VII — 238,0
- VIII — 475,0
- IX — 950,0
- X — 1900,0

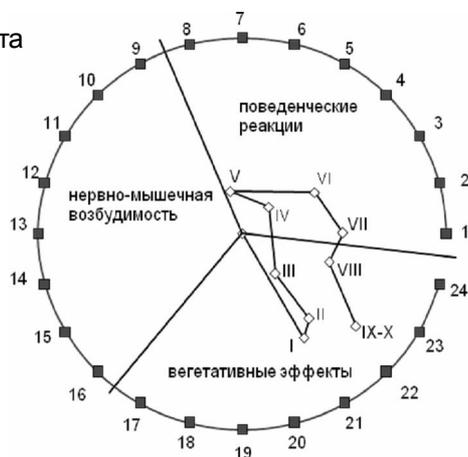


Рис. Интегральная оценка профиля функционально-поведенческой токсичности препарата эноксифол: вокализация — 1, настороженность — 2, активность/пассивность — 3, стереотипия — 4, беспокойство — 5, агрессия — 6, груминг — 7, спонтанная двигательная активность — 8, реакция на прикосновение — 9, реакция на боль — 10, реакция на стук — 11, тремор — 12, подергивание — 13, судороги — 14, расстройство передвижений — 15, тонус конечностей — 16, птоз — 17, размеры зрачка — 18, саливации — 19, урикации — 20, дефекации — 21, температура тела — 22, цвет кожных покровов — 23, частота дыхания — 24

Из представленных результатов интегральной оценки действия эноксифола на функционально-поведенческий статус крыс следует, что фармакологическая и токсикологическая активности эноксифола, в зависимости от используемых доз, неоднородны: в диапазонах доз от 1,9 мг/кг до 15,0 мг/кг и от 475,0 мг/кг до 1900,0 мг/кг в действии вещества, в основном, превалируют вегетотропные эффекты. Однако уровень качества их проявлений в данных диапазонах различен: на первом уровне — это безопасное действие вещества

РУ-185, проявляющее фармакологический эффект; на втором — токсикотропное воздействие вещества, приводящее к гибели животных. В диапазонах доз от 30,0 мг/кг до 238,0 мг/кг фармакологическое воздействие вещества РУ-185, вероятно, максимально и безопасно, где превалируют поведенческие реакции.

Учитывая представленные результаты у исследуемой субстанции вещества РУ-185 рассчитали широту терапевтического индекса (ШТИ), в пределах которого определили диапазоны безопасной фармакологической активности (ДБА) и диапазоны токсичной активности (ДТА) вещества. Установлено, что ШТИ вещества РУ-185 оказался равным 1000 у. е.; ДБА = 240 у. е.; соответственно ДТА = от 475 у. е. до 1000 у. е. В переходе на испытываемые эффективные и безопасные дозы можно заключить, что безопасное фармакологическое действие эноксифола проявляется в диапазоне доз от 1,9 мг/кг до 238 мг/кг с максимально выраженной активностью в дозах от 4-8 мг/кг и 59—119 мг/кг. Токсическое действие эноксифола начинает проявляться в дозах от 475 мг/кг и выше.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, с учетом дозозависимой неоднородности фармакологической и токсикологической активности эноксифола полагаем, что сведения о выявленных уровнях токсичности вещества РУ-185 (эноксифол) и диапазонах его фармакологической и токсической активности целесообразно использовать для выбора доз в последующих доклинических токсикологических исследованиях.

ЛИТЕРАТУРА

1. Березовская И. В. Прогноз безопасности лекарственных средств в доклинических токсикологических исследованиях // Токсикологический вестник. — 2010. — № 5. — С. 17—22.
2. Бугаева Л. И., Веровский В. Е., Йежица И. Н., Спасов А. А. Исследование острой токсичности бромантана // Экспериментальная и клиническая фармакология. — 2000. — № 1. — С. 3—6.
3. Бугаева Л. И., Кузубова Е. А., Букатин М. В., Реброва Д. Н. Влияние эноксифола на гонадотропную функцию самцов крыс // Успехи современного естествознания. — 2006. — № 8. — С. 56.
4. Букатин М. В., Бугаева Л. И., Кузубова Е. А., Спасов А. А. Влияние эноксифола на поведенческую активность крыс-самцов // Вестник Волгоградского государственного медицинского университета. — 2012. — № 1. — С. 93—95.
5. Букатин М. В., Кузубова Е. А., Бугаева Л. И. Изучение профиля функционально-поведенческой токсичности препарата бемитил // Современные наукоемкие технологии. — 2007. — № 11. — С. 53.
6. Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств. Часть первая / Под ред. А. Н. Миронова — М: Гриф и К, 2012. — 944 с.
7. Спасов А. А., Косолапов В. А., Островский О. В. и др. Протиовишемические свойства нового антиоксидантного

средства эноксифол // Экспериментальная и клиническая фармакология. — 2003. — Т. 66, № 4. — С. 17.

8. Спасов А. А., Иежица И. Н., Бугаева Л. И., Анисимова В. А. Спектр фармакологической активности и токсического свойства производных бензимидазола // Химико-фармакологический журнал. — 1999. — № 5. — С.6—17.

9. Федеральный закон от 12 апреля 2010 г. № 61-ФЗ «Об обращении лекарственных средств» (в ред. Федеральных законов от 27.07.2010 № 192-ФЗ, от 11.10.2010 № 271-ФЗ, от 29.11.2010 № 313-ФЗ).

10. Bugayeva L. ., Spasov A. A., Kuzubova E. A., Bukatin M. V. Investigation of neurogenic mechanism of dynamic-behavioural activity of bendazol // European Journal of Natural History. — 2008. — № 1. — P. 81.

11. Irwin S. Drug screening and evaluation of new compounds in animals // Animal and Clinical

Pharmacologic Techiques in Drug Evaluation Chicago, 1964. — P. 36—54.

12. Spasov A. A., Bugaeva L. I., Bukatin M. V., Kuzubova E. A., Rebrova D. N. The influence of a new antioxidatic preparation on the reproductive function of male-rats // European Journal of Natural History. — 2007. — №1. — P. 115—116.

Контактная информация

Букатин Михаил Владимирович — к. м. н., доцент кафедры фундаментальной медицины и биологии, Волгоградский государственный медицинский университет, e-mail: buspak76@mail.ru