

ПОСТНАТАЛЬНОЕ РАЗВИТИЕ ПОТОМСТВА КРЫС ОТ САМОК, ПОЛУЧАВШИХ ПРЕПАРАТ НЕЙРОГЛУТАМ В ПЕРИОД БЕРЕМЕННОСТИ

Л.И. Бугаёва, Т.Д. Денисова, И.Н. Тюренков, Ю.А. Мазанова, В.В. Багметова, Е.Б. Лаврова

НИИ фармакологии ФГБОУ ВО ВолгГМУ Минздрава России, г. Волгоград

В двухмесячных наблюдениях за потомством от крыс самок, получавших с 6-го по 20-й дни беременности препарат нейроглутам в дозе 650 мг/кг (25-кратная терапевтически эффективная доза), установлено отсутствие изменений в физическом развитии у неполовозрелых крысят. При этом в сравнении с группой контрольных у тестируемого потомства крыс прослеживались эффекты: активизации прироста массы тела; опережение сроков созревания мышечной силы и открытие глаз, а также формирование рефлексов переворачивания в свободном падении и избегание обрыва. Опушение яичек в мошонку у крыс самцов и открытие вагины у крыс самок соответствовало физиологической норме и не различалось с контрольными показателями. По результатам исследований сделано заключение об отсутствии повреждающего влияния нейроглутама в дозе 650 мг/кг на процессы органо- и фетогенеза, регистрируемые в постнатальный период развития потомства.

Ключевые слова: антидепрессивное вещество, нейроглутам, производное глутаминовой кислоты, эксперименты на потомстве крыс, доклиническое исследование.

DOI 10.19163/1994-9480-2018-3(67)-33-36

POSTNATAL DEVELOPMENT OF RATS' OFFSPRING FROM FEMALES GETTING NEUROGLUTAME DURING THEIR PREGNANCY

L.I. Bugaeva, T.D. Denisova, I.N. Tyurenkov, J.A. Mazanova, V.V. Bagmetova, E.B. Lavrova

Research Institute of Pharmacology of FSBEI HE «Volgograd State Medical University» of Public Health Ministry of the Russian Federation, Volgograd

The two month long observation of offspring from female rats, which were getting neuroglutame in the dose of 650 mg/kg (25-fold therapeutic dose) from the 6th to the 20th day of pregnancy, showed the absence of changes in physical development. At the same time comparison of the tested rats' offspring with the group of control ones showed effects: activation of body weight increase; surpassing of the terms of muscular strength maturation and opening of eyes, as well as formation of reflex of turning over in the free fall and cliff avoidance. Descent of testicles into the scrotum of the male rats and vagina opening of the female rats matched the physiological standard and did not differ from the control indices. According to the research results there was made a conclusion about the absence of damaging influence of neuroglutame in the dose of 650 mg/kg on the processes of organo- and fetogenesis registered in the postnatal period of the offspring's development.

Key words: antidepressant substance, neuroglutame, derivative of glutamic acid, experiments on the offspring of rats, preclinical research.

Нейроглутам (производное глутаминовой кислоты) новое психотропное средство с выраженным антидепрессивным и анксиолитическим действиями, разработанное Волгоградскими фармакологами совместно с химиками Российского государственного педагогического университета им. А.И. Герцена [1, 10]. Доклиническим токсикологическими исследованиями [1, 2] показано, что по степени токсичности нейроглутам относится к классу малотоксичных. В исследованиях, на крысах самках, нейроглутам в дозах 26 и 650 мг/кг (соответственно терапевтическая и 25-кратная терапевтическая) не оказывал повреждающего влияния на фертильность [3] и на процессы органо-фетогенеза, регистрируемые в антенатальный период развития плодов [4]. Одновременно выявлялись эффекты положительного влияния нейроглутама на качество эмбрионального антенатального развития плодов.

ЦЕЛЬ РАБОТЫ

Изучить влияние нейроглутама на развитие потомства от крыс самок, которым с 6-го по 20-й дни беременности вводили нейроглутам в дозе 650 мг/кг.

МЕТОДИКА ИССЛЕДОВАНИЯ

Наблюдения проведены на 40 фиксированных (по 6 особей) пометах крысят, полученных от 2 групп беременных крыс самок. Первая группа – опытная, состояла из 20 пометов крысят, полученных от крыс самок, которым в период беременности (с 6-го дня беременности и до родов) интрагастрально вводили нейроглутам в дозе 650 мг/кг (соответствует 25-кратной экспериментально доказанной терапевтической дозе). Вторая группа – контрольная, 20 пометов крысят, полученных от крыс самок, которым в эти же сроки, как и в опытной группе, интрагастрально вводили дистиллированную воду в дозе 5 мл/кг. После рождения исследуемые пометы крысят в течение 1-го месяца наблюдений находились вместе с крысой матерью в индивидуальных пластиковых клетках марки Т/2 А- (270х210х140 мм), на подстилке из мелких древесных стружек, со свободным доступом к корму и воде. Содержание животных и проведение на них манипуляций соответствовали нормативным правилам лабораторной практики, утвержденным МЗ РФ Приказ № 199Н от 10 апреля 2016 г и методическим

рекомендациям по изучению репродуктивной токсичности лекарственных средств [7], а также протоколу, утвержденному локальным этическим комитетом за № 140-2011 от 11.06.2011 г.

Наблюдения за потомствами крысят вели от их рождения до 2-месячного возраста [5, 7]. У потомств отмечали: формирование физического развития и сенсорно-двигательных рефлексов, двигательное поведение, мнестические реакции. В физическом развитии у крысят отмечали (в днях): отлипание ушной раковины, появление волосяного покрова, прорезывание резцов, открытие глаз, опускание семенников и открытие вагины. Прирост массы тела (г) у крысят измеряли с 4-го по 30-й дни наблюдений. Формирование сенсорно-двигательных рефлексов (в днях) оценивали в тестах: «переворачивание на плоскости», «отрицательный геотаксис», «избегание обрыва», «зрачковый рефлекс», «избегание обрыва, вызванное визуальным стимулом», «мышечная сила», «переворачивание в свободном падении». Двигательное поведение исследовали у крысят в 20- и 45-дневном возрасте в тесте «открытое поле» [5, 7], отмечали число пересеченных квадратов (горизонтальная активность), вставаний на задние лапки (вертикальная активность), заглядывания в напольные отверстия (исследовательская активность), акты груминга и количество актов дефекаций. Способность крысят к обучению и запоминанию памятного следа оценивали в тесте «УРПИ» [5, 7]. В период обучения у крысят фиксировали время первого захода в темную (опасную) камеру, в которой он подвергался (через электродный пол) электролевному воздействию. Воспроизведение памятного следа проводили через трое суток, после обучения (спонтанная амнезия), фиксируя при этом количество заходов в темную (опасную) камеру.

Результаты исследований подвергали статистической обработке с использованием программы Microsoft Excel. Достоверность изменений в опытной группе относительно группы контроль оценивали с помощью t-критерия Стьюдента с поправкой Бонферрони [6].

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Проведенные исследования позволили выявить отсутствие изменений в постнатальном развитии потомств крысят от крыс самок, получавших в период беременности нейроглутам в дозе 650 мг/кг. Физическое развитие потомств опытных крысят было полностью сформировано к 2-месячному возрасту. Наряду с этим было отмечено, что динамика прироста массы тела у крысят в опытной группе опережала контрольные значения, проявляющиеся в более выраженной форме у крыс самцов (табл. 1), нежели у самок. Так, масса тела у 4-дневных крысят в опытной группе была выше контрольных показателей на 1,5 г ($p < 0,01$) у самцов и на 0,7 г ($p > 0,05$) у самок; у 3-недельных крысят – на 4,3 г ($p < 0,001$) у самцов и на 0,3 г ($p > 0,05$) у самок, а у месячных крысят – на 6,1 г ($p < 0,01$) у самцов и на 2,7 г ($p > 0,05$) у самок.

Таблица 1

Прирост массы тела потомства (г, $M \pm m$) от самок, получавших интрагастрально нейроглутам в период беременности

Периоды измерений, дни	Варианты опытов	
	контрольная группа	опытная группа
Самцы		
4	10,80 ± 0,38	12,30 ± 0,23**
7	16,60 ± 0,38	18,90 ± 0,31***
14	28,70 ± 0,63	30,90 ± 0,82*
21	41,50 ± 0,87	45,80 ± 0,87***
30	70,10 ± 0,94	76,20 ± 0,92***
Самки		
4	10,4 ± 0,2	11,10 ± 0,27
7	16,30 ± 0,29	17,30 ± 0,43
14	28,60 ± 0,53	28,70 ± 0,51
21	41,30 ± 0,83	41,60 ± 0,83
30	68,50 ± 0,69	71,20 ± 0,93

* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ – достоверно относительно контрольной группы.

Эффекты активизации у опытного потомства выявлялись и в некоторых параметрах их физического развития. Относительно группы интактного потомства у потомств опытных крысят (табл. 2) отмечалось опережение сроков созревания: открытия глаз (на 0,7 дня, $p < 0,001$), формирования «зрачкового рефлекса» (на 0,9 дня, $p < 0,001$), «избегание обрыва, вызванного визуальным стимулом» (на 1,1 дня, $p < 0,001$), «переворачивания в свободном падении» (на 1,0 день, $p < 0,001$) и формирование теста «мышечная сила» (на 0,3 дня, $p > 0,05$), с одновременным запаздыванием формирования рефлекса «переворачивание на плоскости» (на 0,6 дня, $p < 0,01$). Сроки же опущения яиц в мошонку у крыс самцов и открытие вагины у крыс самок в опытной группе соответствовали физиологической норме и не различались с контрольными данными.

Таблица 2

Физическое развитие и формирование сенсорно-двигательных рефлексов у потомств, (дни, $M \pm m$) от крыс самок, получавших в период беременности интрагастрально нейроглутам, дни

Исследуемые параметры	Варианты опытов	
	контрольная группа	опытная группа
Отлипание ушной раковины	2,80 ± 0,09	2,90 ± 0,04
Появление волосяного покрова	4,40 ± 0,06	4,50 ± 0,06
Прорезывание резцов	8,00 ± 0,11	8,20 ± 0,12
Открытие глаз	15,80 ± 0,05	15,1 ± 0,12**
Опускание семенников	26,0 ± 0,1	26,0 ± 0,0
Открытие вагины	47,00 ± 0,56	47,90 ± 0,46
Переворачивание на плоскости	3,60 ± 0,06	4,20 ± 0,12*

Окончание таблицы 2

Исследуемые параметры	Варианты опытов	
	контрольная группа	опытная группа
Отрицательный геотаксис	6,40 ± 0,06	6,40 ± 0,14
Избегание обрыва	6,90 ± 0,04	6,80 ± 0,08
Зрачковый рефлекс	16,10 ± 0,08	15,2 ± 0,1**
Избегание обрыва (вызванное визуальным стимулом)	16,30 ± 0,09	15,2 ± 0,1**
Мышечная сила	18,40 ± 0,13	18,1 ± 0,28
Переворачивание в свободном падении	19,20 ± 0,14	18,20 ± 0,12**

* $p < 0,01$, ** $p < 0,001$ – различия достоверны относительно контрольной группы.

В исследованиях теста «открытое поле» эффекты изменений в двигательном поведении отмечены лишь у потомств крыс 20-дневного возраста. Относительно группы контрольного потомства, у крысят в опытной группе зафиксировано (табл. 3) достоверное повышение горизонтальной активности (28,9 %, $p < 0,05$), исследовательской активности (66,7 %, $p < 0,05$) и актов груминга (45,4 %, $p < 0,05$) без существенных изменений других параметров.

Таблица 3

Влияние нейроглутама (внутрижелудочно с 6-го по 20-й дни беременности крысам матерям) на двигательную активность 20-дневных крысят в тесте «открытое поле» ($M \pm m$)

Исследуемые параметры	Варианты опытов	
	контрольная группа	опытная группа
Горизонтальная активность	24,60 ± 0,76	31,70 ± 0,71***
Вертикальная активность	4,20 ± 0,31	5,30 ± 0,52
Исследовательская активность	1,50 ± 0,18	2,50 ± 0,31**
Акты груминга	1,1 ± 0,1	1,60 ± 0,15*
Акты дефекаций	0,80 ± 0,12	1,00 ± 0,13

* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ – различия достоверны относительно контрольной группы.

Вместе с тем в подобных исследованиях, проведенных на потомствах опытных и контрольных крысят 1,5-месячного возраста различий в изучаемых параметрах поведенческой активности не зафиксировано. Не обнаружено у тестируемых потомств в 2-месячном возрасте изменений и в развитии мнестических реакций. В исследованиях теста «УРПИ» крысята опытной и контрольной групп не различались по характеру обучения и воспроизведения памятного следа. При воспроизведении (на третий день после обучения) количество заходов крысят в темную (опасную) камеру и время нахождения в ней у особей контрольной и опытной групп было идентичным.

Таким образом, из проведенных исследований можно сделать заключение, что нейроглутам при внутрижелудочном введении беременным крысам самкам в дозе 650 мг/кг (доза, превышающая экспериментально доказанную терапевтическую в 25 раз) с 6-го по 20-й дни беременности не оказывает повреждающего влияния на процессы антенатального развития плодов крыс, регистрируемые в постнатальном периоде. Показано, что физическое развитие потомств крыс в опытной группе было полностью сформировано. Негативных отклонений в постнатальном развитии у опытных потомств не зарегистрировано. Вместе с тем фиксирующиеся эффекты повышения прироста массы тела, отдельных параметров физического созревания и двигательного поведения были зарегистрированы у потомств опытных крысят, находившихся на молочном вскармливании (т.е. до 20-дневного возраста), и следы этих эффектов у крысят, находившихся на дефинитивном питании (т.е. до 30-дневного возраста), практически не регистрировались в последующем. В данном отношении можно предположить возможность накопления нейроглутама в организме у самки крысы при введении ей его с 6-го по 20-й дни беременности, а также и проникновение нейроглутама через маточно-плацентарный барьер и попадание в кровотоки плодов крыс самок, получавших его во время беременности, а после в родовом периоде – последующее остаточное его проникновение с молоком кормящей самки в организм крысят и его влияние на пищевое поведение, двигательную активность, физическое развитие потомства. Подобные эффекты (повышение массы тела и физическое развитие) были зарегистрированы и в исследованиях по изучению влияния на генеративную функцию крыс самок [3]. В пользу данного предположения свидетельствуют и результаты фармакокинетических исследований [8, 9], в которых было показано, что наряду с высокой абсолютной биодоступностью (84 %) период его полувыведения составляет 13,61 часа, среднее время удерживания в организме одной молекулы равно 15,37 часа [9], а наличие нейроглутама в моче определяется в течение не менее 72 часов после однократного введения, при этом максимум выведения приходится на 2-е сутки [8].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

1. Нейроглутам, новый препарат с андепрессивным и анксиолитическим действием в дозе 650 мг/кг (25-кратная терапевтическая доза) при внутрижелудочном введении беременным самкам не оказывает повреждающего антенатального действия, регистрируемого в постнатальном периоде.

2. Постнатальное развитие потомств крыс, от самок крыс, получавших в период беременности нейроглутам полностью сформировывается к 2-месячному возрасту, без негативных эффектов.

ЛИТЕРАТУРА

1. Багметова В.В., Чернышева Ю.В., Меркушенкова О.В., Берестовицкая В.М., Васильева О.С., Тюренков И.Н. Сравнительная оценка антидепрессивных свойств

гидрохлорида β-фенилглутаминовой кислоты (РГПУ-135, глутарон) // Экспериментальная и клиническая фармакология. – 2013. – № 76 (3). – С. 7–9.

2. Бугаева Л.И., Тюренокв И.Н., Багметова В.В., Чернышева Ю.В., Кузубова Е.А. Острая токсичность субстанции гидрохлорида β-фенилглутаминовой кислоты при однократном внутривентрикулярном введении мышам и крысам // Вестник Волгоградского государственного медицинского университета. – 2012. – № 4 (44). – С. 34–37.

3. Бугаева Л.И., Кузубова Е.А., Мальцев М.В., Морозова Ю.А., Тюренокв И.Н., Багметова В.В. Влияние нового производного глутаминовой кислоты (нейроглутам) с антидепрессивной активностью на генеративную функцию крыс-самцов // Экспериментальная и клиническая фармакология. – 2017. – № 3 (80). – С. 10–13.

4. Бугаева Л.И., Тюренокв И.Н., Денисова Т.Д., Морозова Ю.А. Влияние нового вещества с антидепрессивной активностью на процессы органо- и фетогенеза, регистрируемые в антенатальный период развития // Экспериментальная и клиническая фармакология. – 2016. – № 9 (79). – С. 25–28.

5. Буреш Я., Бурешова О., Хьюстон Д.П. Методики и основные эксперименты по изучению мозга и поведения. – М.: Высшая школа, 1991. – 210 с.

6. Гублер Е.В. Вычислительные методы анализа и распознавания патологических процессов. – Ленинград: «Медицина», 1978. – 294 с.

7. Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств / Под ред. А.Н. Миронова. – М., 2012.

8. Смирнова Л.А., Сучков Е.А., Рябуха А.Ф., Кузнецов К.А., Озеров А.А., Караваев А.В. Экскреция соединения VMA-99-82 – нового производного аденина, обладающего противовирусной активностью // Фармакокинетика и фармакодинамика. – 2013. – № 1. – С. 40–42.

9. Смирнова Л.А., Рябуха А.Ф., Кузнецов К.А., Сучков Е.А., Перфилова В.Н., Тюренокв И.Н. Абсолютная и относительная биодоступность нового производного глутаминовой кислоты – глутарона // Экспериментальная и клиническая фармакология. – 2015. – № 78 (12). – С. 23–25.

10. Тюренокв И.Н., Багметова В.В., Чернышева Ю.В., Меркушенкова О.В., Берестовицкая В.М., Васильева О.С. Сравнение психотропных свойств глутаминовой кислоты и ее нового производного – гидрохлорида бета-фенилглутаминовой кислоты (глутарона) // Фундаментальные исследования. – 2013. – № 3–1. – С. 167–172.

REFERENCES

1. Bagmetova V.V., Chernysheva YU.V., Merkushechkova O.V., Berestovickaya V.M., Vasil'eva O.S., Tyurenkov I.N. Sravnitel'naya ocenka antidepressivnykh svoystv gidrohlorida β-fenilglutaminovoj kisloty (RGPU-135, glutaron) [Comparative evaluation of antidepressant properties of β-phenylglutamic acid hydrochloride (RGPU-135, glutarone)]. *EHksperimental'naya i klinicheskaya farmakologiya* [Experimental and Clinical Pharmacology], 2013, no. 76 (3), pp. 7–9. (In Russ.; abstr. in Engl.).

2. Bugaeva L.I., Tyurenkov I.N., Bagmetova V.V., Chernysheva YU.V., Kuzubova E.A. Ostraya toksichnost' substancii gidrohlorida β-fenilglutaminovoj kisloty pri

odnokratnom vnutrizheludochnom vvedenii mysham i kryсам [Acute toxicity of substance of β-phenylglutamic acid hydrochloride with single intragastric administration to mice and rats]. *Vestnik Volgogradskogo gosudarstvennogo medicinskogo universiteta* [Journal of Volgograd State Medical University], 2012, no. 4 (44), pp. 34–37. (In Russ.; abstr. in Engl.).

3. Bugaeva L.I., Kuzubova E.A., Mal'cev M.V., Morozova YU.A., Tyurenkov I.N., Bagmetova V.V. Vliyanie novogo proizvodnogo glutaminovoj kisloty (nejroglutam) s antidepressivnoj aktivnost'yu na generativnuyu funkciu kryс-samcov [The effect of a new glutamic acid derivative (neuroglutam) with antidepressant activity on the generative function of male rats]. *EHksperimental'naya i klinicheskaya farmakologiya* [Experimental and Clinical Pharmacology], 2017, no. 3 (80), pp. 10–13. (In Russ.; abstr. in Engl.).

4. Bugaeva L.I., Tyurenkov I.N., Denisova T.D., Morozova YU.A. Vliyanie novogo veshchestva s antidepressivnoj aktivnost'yu na processy organo- i fetogeneza, registriruemye v antenatal'nyj period razvitiya [The effect of a new substance with antidepressant activity on the processes of organo- and fetogenesis, registered in the antenatal period of development]. *EHksperimental'naya i klinicheskaya farmakologiya* [Experimental and Clinical Pharmacology], 2016, no. 9 (79), pp. 25–28. (In Russ.; abstr. in Engl.).

5. Buresh YA., Bureshova O., H'yuston D.P. Metodiki i osnovnye ehksperimenty po izucheniyu mozga i povedeniya [Techniques and basic experiments on the study of the brain and behavior]. Moscow: Vysshaya shkola, 1991. 210 p.

6. Gubler E.V. Vychislitel'nye metody analiza i raspoznavaniya patologicheskikh processov [Computational methods of analysis and recognition of pathological processes]. Leningrad: «Medicina», 1978. 294 s.

7. Rukovodstvo po provedeniyu doklinicheskikh issledovaniy lekarstvennykh sredstv [Guidelines for preclinical drug research]. In A.N. Mironov (ed.). Moscow, 2012.

8. Smirnova L.A., Suchkov E.A., Ryabuha A.F., Kuznecov K.A., Ozerov A.A., Karavaev A.V. EHkskreciya soedineniya VMA-99-82 – novogo proizvodnogo adenina, obladayushchego protivovirusnoj aktivnost'yu [Excretion of compound VMA-99-82, a new adenine derivative with antiviral activity]. *Farmakokinetika i farmakodinamika* [Pharmacokinetics and pharmacodynamics], 2013, no. 1, pp. 40–42. (In Russ.; abstr. in Engl.).

9. Smirnova L.A., Ryabuha A.F., Kuznecov K.A., Suchkov E.A., Perfilova V.N., Tyurenkov I.N. Absolyutnaya i otnositel'naya biodostupnost' novogo proizvodnogo glutaminovoj kisloty – glutarona [Absolute and relative bioavailability of the new glutamic acid derivative]. *EHksperimental'naya i klinicheskaya farmakologiya* [Experimental and Clinical Pharmacology], 2015, no. 78 (12), pp. 23–25. (In Russ.; abstr. in Engl.).

10. Tyurenkov I.N., Bagmetova V.V., Chernysheva YU.V., Merkushechkova O.V., Berestovickaya V.M., Vasil'eva O.S. Sravnenie psihotropnykh svoystv glutaminovoj kisloty i ee novogo proizvodnogo – gidrohlorida beta-fenilglutaminovoj kisloty (glutarona) [Comparison of psychotropic properties of glutamic acid and its new derivative – beta-phenylglutamic acid hydrochloride (glutarone)]. *Fundamental'nye issledovaniya* [Basic research], 2013, no. 3–1, pp. 167–172. (In Russ.; abstr. in Engl.).

Контактная информация

Бугаева Любовь Ивановна – д. б. н., заместитель директора НИИ фармакологии ВолгГМУ, e-mail: li_bugaeva@mail.ru