

Влияние нового соединения, проявляющего гипогликемическую активность, на процессы репродукции крыс-самок

Л.И. Бугаева^{1,2}, Т.Д. Денисова^{1,2}✉, И.Н. Тюренков¹, В.И. Петров¹, Н.С. Мелихова¹

¹ Волгоградский государственный медицинский университет, Волгоград, Россия

² Волгоградский медицинский научный центр, Волгоград, Россия

Аннотация. В экспериментах, на крысах самках, новое вещество дипиарон с гипогликемической активностью при внутрижелудочном введении в дозах 0,5 и 100 мг/кг с 6-й по 16-й дни беременности не оказывало повреждающего действия на процессы органо- и фетогенеза и не способствовало возникновению уродств и аномалий развития плодов, регистрируемых в антенатальном и постнатальном периоде их развития. При внутрижелудочном введении дипиарона крысам-самкам в дозе 100 мг/кг с 6-го дня беременности и до родов показано, что формирование физического развития потомств крыс в постнатальном периоде соответствует показателям контроля, при этом у них отмечалось повышение темпов прироста массы тела, опережение сроков формирования сенсорно-двигательных рефлексов, активизация двигательного и эмоционального поведения.

Ключевые слова: доклинические исследования, гипогликемическое действие, репродуктивная токсичность, крысы-самки, антенатальный и постнатальный период, органогенез

ORIGINAL RESEARCHES

Original article

doi: <https://doi.org/10.19163/1994-9480-2023-20-2-78-82>

Aspects of effect of novel compound exhibiting hypoglycemic activity on female rat reproduction processes

L.I. Bugaeva^{1,2}, T.D. Denisova^{1,2}✉, I.N. Tyurenkov¹, V.I. Petrov¹, N.S. Melikhova¹

¹ Volgograd State Medical University, Volgograd, Russia

² Volgograd Medical Research Center, Volgograd, Russia

Abstract. In experiments, in female rats, the novel substance dipiarone with hypoglycemic activity when administered intragastrically at doses of 0.5 mg/kg and 100 mg/kg from 6 to 16 days of gestation did not have a damaging effect on the processes of organo- and fetogenesis and did not contribute to the occurrence of deformities and abnormalities in the development of fetuses recorded in the antenatal and postnatal period of their development. Intragastric administration of dipiarone to rats at a dose of 100 mg/kg from 6 days of pregnancy until delivery showed that the formation of physical development of rat offspring in the postnatal period corresponds to the control parameters, while they had an increase in the rate of body weight gain, ahead of the time of formation of sensory-motor reflexes, activation of motor and emotional behavior.

Keywords: preclinical studies, hypoglycemic action, reproductive toxicity, female rats, antenatal and postnatal period, organogenesis

Доклинические исследования новых фармакологических веществ, проявляющих гипогликемическую активность на процессы репродукции, представляют большой интерес и являются актуальными. Новое соединение дипиарон синтезировано ЗАО «ИИХР» Московская обл., г. Химки, Россия. Ранее проведенные исследования [1, 2, 3], показали наличие у него высокой гипогликемической активности и низкой токсичности [4]. При этом было установлено, что терапевтическая эффективность соединения проявляется в дозе 0,5 мг/кг, что составляет 1/800 от ЛД₅₀ [4].

ЦЕЛЬ РАБОТЫ

Исследовать влияние дипиарона на процессы пре- и постнатального развития плодов.

МЕТОДИКА ИССЛЕДОВАНИЯ

Исследования проведены на 100 конвенциональных белых крысах самках 4-месячного возраста, закупленных в питомнике ГУП НИИГТИП МЗ РФ (г. Волгоград) и прошедших двухнедельный карантин до начала исследования. Содержание животных и проводимых манипуляций проводилось с учетом методических рекомендаций «Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств» 2012 г. [5] и Межгосударственного стандарта ГОСТ 33044-2014 «Принципы надлежащей лабораторной практики».

Для проведения исследования крысы самки были подразделены на 5 групп по 20 особей в каждой. На первом этапе исследования дипиарон вводили внутрижелудочно крысам самкам с 6-го по 16-й дни беременности в дозах 0,5 мг/кг (опытная 1-я группа) и 100 мг/кг

(опытная 2-я группа). На втором этапе это соединение в дозе 100 мг/кг вводили внутривенно крысам самкам с 6-го дня беременности и до родов (опытная 3-я группа). Крысам самкам контрольных групп (соответственно 1 и 2) в эти же сроки вводили внутривенно дистиллированную воду, которую использовали в качестве растворителя исследуемого соединения.

Первым днем беременности у крыс самок, накануне спаренных с интактными самцами, считали день обнаружения сперматозоидов в вагинальном мазке [5]. Забеременевших самок размещали по одной особи в пластиковые клетки на подстилке из мелких древесных стружек на весь период наблюдений. У этих крыс самок оценивали общее состояние и прирост массы тела. Измерение массы тела у них проводили на первый, шестой, шестнадцатый и двадцатый дни беременности. Вес тела выражали в г, а прирост относительно первого дня – в процентах. На 20-й день беременности крыс самок 1-й и 2-й опытных групп подвергали эвтаназии (метод дислокации шейных позвонков) и некропсии, а самок 3-й опытной группы оставляли до родов. При некропсии у беременных крыс самок 1-й и 2-й опытных групп выделяли яичники и рога матки, в которых подсчитывали количество желтых тел беременности, живых и резорбированных плодов, мест имплантаций. На основании полученных результатов рассчитывали эмбриональную гибель. После макроскопического обследования выделенных плодов проводили их взвешивание, измерение краниокаудального размера и определение пола. Затем часть плодов фиксировали

в жидкости Буэна по методу Вильсона для изучения состояния внутренних органов, другую – фиксировали в этаноле 96°, с последующим окрашиванием скелета ализарином, по методу Доусона для изучения состояния скелета [5]. За беременными крысами самками 3-й опытной группы продолжали проводить наблюдения до родоразрешения, а в последующем наблюдения вели за потомством крысят до достижения ими двухмесячного возраста. У развивающихся крысят отмечали: общее состояние, прирост массы тела, параметры формирования физического развития и сенсорно-двигательных рефлексов, а также двигательное и эмоциональное поведение (тест «открытое поле»), способность к обучению и запоминанию (тест «УРПИ») [5].

Полученные данные подвергали статистической обработке в программе Microsoft Excel, с использованием t критерия Стьюдента.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

По результатам наблюдений первого этапа исследований у крыс самок в 1-й и 2-й опытных группах относительно 1-й контрольной группы не обнаруживалось изменений в общем состоянии и поведении на протяжении всего периода беременности. Прирост массы тела у крыс самок в 1-й опытной группе был положительным и практически соответствовал контрольным показателям. У крыс самок 2-й опытной группы прирост массы тела статистически незначимо снижался в среднем на 22,5 Δ% по сравнению с контролем (табл. 1).

Таблица 1

Влияние дипиарона (внутрижелудочно, 6–16-й дни беременности) на прирост массы тела беременных крыс, г, $M \pm m$ (%)

Периоды измерений, дни	Контрольная группа 1 дистиллированная вода	Опытная группа 1 дипиарон, 0,5 мг/кг	Опытная группа 2 дипиарон, 100 мг/кг
Исход	229,00 ± 6,79	228,6 ± 4,4	227,10 ± 4,76
6	250,90 ± 5,57	249,40 ± 5,68	251,10 ± 6,82
16	290,10 ± 6,99 (26,7)	283,10 ± 5,58 (23,8)	274,20 ± 6,71 (20,7)
20	305,00 ± 7,83	302,80 ± 6,75	294,60 ± 9,13

По результатам проведения некропсии у крыс самок в 1-й опытной группе не обнаружено достоверных изменений, но отмечена тенденция снижения послеимплантационной гибели плодов в 2,3 раза ($p > 0,05$) и числа резорбций относительно контрольных значений (табл. 2). У крыс самок во 2-й опытной группе прослеживалась тенденция увеличения доимплантационной гибели плодов в 3,3 раза ($p < 0,05$), но снижения плодовитости на 34,9 % ($p < 0,05$) и отсутствие послеимплантационной гибели плодов. Наряду с этим необходимо отметить, что у выделенных плодов от самок этих опытных групп относительно контроля прослеживалась тенденция дозозависимого повышения массы тела на 4,8 % ($p > 0,05$) и 9,5 % ($p > 0,05$) соответственно и краниокаудальных

размеров. Также при визуальном обследовании плодов в этих опытных группах не отмечено уродств, аномалий развития и подкожных геморрагий.

Оценивая процессы оссификации скелета у плодов в 1-й и 2-й опытных группах, обнаружили дозозависимую тенденцию увеличения числа оссифицированных точек в области грудины на 6,2 % ($p > 0,05$) и 12,5 % ($p < 0,05$) соответственно и пястных на 3,7 % ($p > 0,05$) и 11,1 % ($p < 0,05$) соответственно по отношению к 1-й контрольной группе. На послойных срезах у этих плодов в опытных группах не зарегистрировано дефектов развития и кровоизлияний во внутренние органы, что может свидетельствовать об отсутствии повреждающего влияния дипиарона на качество антенатального развития плодов.

Таблица 2

**Влияние дипиарона (внутрижелудочно, 6–16-й дни беременности)
на процессы эмбрионального развития плодов, $M \pm t$**

Параметры на одну самку	Контрольная группа 1 дистиллированная вода	Опытная группа 1 дипиарон, 0,5 мг/кг	Опытная группа 2, дипиарон, 100 мг/кг
Желтые тела, абс.	12,60 ± 0,79	12,6 ± 0,6	11,30 ± 0,65
Места имплантаций, абс.	11,20 ± 0,76	10,30 ± 0,52	7,3 ± 0,4*
Резорбции, абс.	0,30 ± 0,15	0,1 ± 0,1	0,20 ± 0,13
Плоды, абс.	10,90 ± 0,62	10,20 ± 0,51	7,10 ± 0,31*
Доимплантационная гибель, %	10,6 ± 3,5	17,60 ± 3,85	35,30 ± 1,07*
Послеимплантационная гибель, %	2,10 ± 1,07	0,90 ± 0,91	2,20 ± 1,48
Размеры, см	3,10 ± 0,02	3,20 ± 0,07	3,20 ± 0,05
Масса, г	2,10 ± 0,12	2,20 ± 0,06	2,30 ± 0,11

* $p < 0,05$ – результаты статистически значимы относительно контрольной группы

Таким образом, из результатов, проведенных на первом этапе исследований, можно предположить, что дипиарон в дозах 0,5 мг/кг и 100 мг/кг при внутрижелудочном введении крысам самкам с 6-й по 16-й дни беременности не оказывает повреждающего влияния на качество пренатального развития плодов, не вызывает у них уродств и аномалий развития.

Учитывая то, что дипиарон, вводимый крысам самкам с 6-го по 16-й дни беременности в дозе 100 мг/кг не оказывает эмбрио- и фетотоксического действия, при этом несколько снижает плодовитость, но способствует повышению массы тела плодов и процессов оссификации скелета, сочли целесообразным на втором этапе исследований это соединение вводить крысам самкам с 6-го дня беременности и до родов в дозе 100 мг/кг.

При проведении второго этапа исследований установлено, что в период молочного вскармливания потомства прирост массы тела крыс самок 3-й опытной группы был практически сопоставим контрольным значениям. При этом различий по особенностям периода гнездования крыс самок перед родами и отношения их к появившемуся потомству не выявлялось. Случаев отказа от вскармливания крысой матерью новорожденных крысят не наблюдалось.

В физическом развитии потомств крыс 3-й опытной группы была отмечена достоверная тенденция большего прироста их массы тела относительно контроля на протяжении всего периода 2-месячных наблюдений (табл. 3).

Наряду с этим у крысят в опытной группе относительно контроля достоверно опережались сроки прорезывания резцов (1,5 дня, $p < 0,05$), открытия глаз (1,7 дня, $p < 0,05$), вагины у самок (7,2 дня, $p < 0,05$), а также сроки формирования зрачкового рефлекса (1,7 дня, $p < 0,05$), избегания обрыва, вы-

званного визуальным стимулом (1,7 дня, $p < 0,05$), рефлекса переворачивания на плоскости (0,3 дня, $p < 0,05$) и в свободном падении (0,7 дня, $p < 0,05$), избегание обрыва (0,1 дня, $p < 0,05$), мышечная сила (1,0 дня, $p < 0,05$), но запаздывали сроки опускания семенников у самцов (0,5 дня, $p < 0,05$) и рефлекса «отрицательный геотаксис» (0,5 дня, $p < 0,05$), тогда как по другим параметрам достоверных различий не обнаружено (табл. 4).

Таблица 3

Масса тела крысят (крысам-матерям дипиарон вводили внутрижелудочно, с 6-го дня беременности по день родов) в постнатальный период развития, $M \pm t$, г

Периоды измерений, дни	Контрольная группа 2 дистиллированная вода	Опытная группа 3 дипиарон, 100 мг/кг
<i>Самцы</i>		
4	8,30 ± 0,18	8,50 ± 0,29
7	10,3 ± 0,2	11,70 ± 0,52*
14	15,10 ± 0,35	22,80 ± 0,42*
21	20,90 ± 0,59	31,50 ± 0,57*
30	30,30 ± 0,55	54,60 ± 0,58*
60	113,80 ± 0,76	152,50 ± 0,66*
<i>Самки</i>		
4	8,40 ± 0,22	8,10 ± 0,27
7	10,40 ± 0,46	11,80 ± 0,30*
14	15,70 ± 0,65	22,90 ± 0,43*
21	21,00 ± 0,57	31,80 ± 0,51*
30	30,10 ± 0,85	53,10 ± 0,43*
60	115,60 ± 0,67	153,1 ± 0,6*

* $p < 0,05$ – результаты статистически значимы относительно контрольной группы.

Таблица 4

Физическое развитие крысят (крысам матерям дипиарон вводили внутрижелудочно, с 6-го дня беременности по день родов) в постнатальный период, $M \pm m$

Параметры, дни	Контрольная группа 2 дистиллированная вода	Опытная группа 3 дипиарон, 100 мг/кг
Отлипание ушной раковины	3,70 ± 0,12	3,60 ± 0,11
Появление волосяного покрова	4,70 ± 0,06	4,60 ± 0,09
Прорезывание резцов	8,50 ± 0,13	7,00 ± 0,09*
Открытие глаз	17,40 ± 0,16	15,70 ± 0,22*
Опускание семенников	26,10 ± 0,05	26,60 ± 0,23*
Открытие вагины	57,60 ± 0,86	50,40 ± 0,88*
Перевоорачивание на плоскости	4,70 ± 0,06	4,40 ± 0,10
Отрицательный геотаксис	6,40 ± 0,06	6,90 ± 0,19*
Избегание обрыва	8,60 ± 0,14	8,50 ± 0,23*
Зрачковый рефлекс	17,40 ± 0,16	15,70 ± 0,21
Избегание обрыва, вызванное визуальным стимулом	17,40 ± 0,16	15,70 ± 0,21
Мышечная сила	19,60 ± 0,14	18,60 ± 0,15
Перевоорачивание в свободном падении	20,10 ± 0,10	19,40 ± 0,13

* $p < 0,05$ – результаты статистически значимы относительно контрольной группы.

В поведенческой активности потомств опытной группы крысят на 20- и 45-дневного возраста (тест «открытое поле»), относительно контроля, установлено увеличение локомоторной (число горизонтальных передвижений, вертикальных стоек) и эмоциональной активностей (акты груминга и дефекаций), но снижение исследовательской активности (заглядывания в напольные отверстия). При изучении формирования памятного следа (тест «УРПИ») у крысят опытной и контрольной групп достоверных различий процессов обучаемости не обнаружено.

Таким образом, из полученных результатов исследований второго этапа можно предположить, что дипиарон при внутрижелудочном введении беременным крысам самкам в дозе 100 мг/кг с 6-го дня беременности и до родов не оказывает повреждающего действия на процессы постнатального развития крысят. При этом у потомств крысят указанное соединение способствует большему приросту массы тела, формированию сенсорно-двигательных рефлексов, активации двигательной и эмоциональной активности.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Дипиарон при внутрижелудочном введении беременным крысам в дозах 0,5 и 100 мг/кг в период органогенеза не влияет на их общее состояние и не оказывает эмбрио- и фетотоксического действия, регистрируемого в антенатальный период развития.

Дипиарон в дозах 0,5 и 100 мг/кг, вводимый крысам самкам в период органогенеза не повреждает процессы формирования закладки внутренних органов, не вызывает уродств и аномалий развития, способ-

ствует активизации массы тела плодов и процессов ossификации скелета.

У потомств крыс от самок, получавших дипиарон в дозе 100 мг/кг в период с 6-го дня и до родов, повышается прирост массы тела, ускоряются процессы физического развития и сенсорно-двигательных рефлексов, активизируется двигательное и эмоциональное поведение.

СПИСОК ИСТОЧНИКОВ

1. Куркин Д.В., Логвинова Е.О., Бакулин Д.А. и др. Эндотелиопротекторные свойства нового агониста рецептора $gpr119$ (дипиарон) у животных с хроническим нарушением мозгового кровообращения и экспериментальным сахарным диабетом. *Современные проблемы науки и образования*. 2018;4:235. URL: <https://science-education.ru/ru/article/view?id=27935>.
2. Тюренков И.Н., Бакулин Д.А., Куркин Д.В. и др. Агонисты GPR1 19 рецепторов: характеристика, физиологическая роль и перспективы использования в терапии сахарного диабета 2 и метаболического синдрома. *Успехи физиологических наук*. 2015;4:28–37.
3. Тюренков И.Н., Куркин Д.В., Бакулин Д.А. и др. Гипогликемическая активность новых агонистов рецепторов глюкагоноподобного пептида-1. *Экспериментальная и клиническая фармакология*. 2020;2(83):27–33. doi: 10.30906/0869-2092-2020-83-2-27-33.
4. Бугаева Л.И., Кузубова Е.А., Мальцев М.В. и др. Влияние агониста рецепторов GPR-119 (соединения ZB-16) на сперматогенез и оплодотворяющую функцию крыс-самцов. *Вестник Волгоградского государственного медицинского университета*. 2020;3:103–106. doi: 10.19163/1994-9480-2020-3(75)-103-106.

5. Миронов А. Н. Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств. 1 ч. М., 2012.

REFERENCES

1. Kurkin D.V., Logvinova E.O., Bakulin D.A. et al. Endothelioprotective properties of a novel gpr119 receptor agonist (dipiarone) in animals with chronic cerebrovascular accident and experimental diabetes mellitus. *Sovremennye problemy nauki i obrazovaniya = Modern problems of science and education*. 2018;4:235. (In Russ.). URL: <https://science-education.ru/ru/article/view?id=27935>.

2. Tyurenkov I.N., Bakulin D.A., Kurkin D.V. et al. GPR19 receptor agonists: characterization, physiological role and prospects for use in the therapy of diabetes mellitus 2 and meta-

bolic syndrome. *Uspekhi fiziologicheskikh nauk = Advances in physiological sciences*. 2015;4:28–37. (In Russ.).

3. Tyurenkov I.N., Kurkin D.V., Bakulin D.A. et al. Hypoglycemic activity of novel glucagon-like peptide-1 receptor agonists. *Ekspierimental'naya i klinicheskaya farmakologiya = Experimental and Clinical Pharmacology*. 2020;2(83):27–33. (In Russ.). doi: 10.30906/0869-2092-2020-83-2-27-33.

4. Bugaeva L.I., Kuzubova E.A., Maltsev M.V. et al. The influence of the agonist of receptors GPR-119 (compounds ZB-16) on spermatogenesis and fertilization function of male rats. *Vestnik Volgogradskogo gosudarstvennogo medicinskogo universiteta = Journal of Volgograd State Medical University*. 2020;3:103–106. (In Russ.). doi: 10.19163/1994-9480-2020-3(75)-103-106.

5. Mironov A.N. Guidelines for Preclinical Studies of Medicinal Products. 1 part. Moscow, 2012. (In Russ.).

Конфликт интересов. Авторы декларируют отсутствие явных и потенциальных конфликтов интересов, связанных с публикацией настоящей статьи.

Информация об авторах

Любовь Ивановна Бугаева – доктор биологических наук, заместитель директора, заведующая лабораторией токсикологии, Научный центр инновационных лекарственных средств с опытно-промышленным производством, Волгоградский государственный медицинский университет; Волгоградский медицинский научный центр, Волгоград, Россия; li_bugaeva@mail.ru

Татьяна Дмитриевна Денисова – кандидат биологических наук, старший научный сотрудник лаборатории токсикологии, Научный центр инновационных лекарственных средств с опытно-промышленным производством, Волгоградский государственный медицинский университет; Волгоградский медицинский научный центр, Волгоград, Россия; tanyadennisova@mail.ru

Иван Николаевич Тюренков – член-корреспондент РАН, профессор, доктор медицинских наук, заведующий кафедрой фармакологии и фармации, Институт непрерывного медицинского и фармацевтического образования, Волгоградский государственный медицинский университет, Волгоград, Россия; fibfuv@mail.ru

Владимир Иванович Петров – академик РАН, заслуженный деятель науки РФ, заслуженный врач РФ, доктор медицинских наук, профессор, директор, Научный центр инновационных лекарственных средств с опытно-промышленным производством, Волгоградский государственный медицинский университет, Волгоград, Россия; brain@sprintnet.ru

Наталья Сергеевна Мелихова – младший научный сотрудник лаборатории токсикологии, Научный центр инновационных лекарственных средств с опытно-промышленным производством, Волгоградский государственный медицинский университет, Волгоград, Россия; bugnatasha7@mail.ru

Статья поступила в редакцию 13.01.2023; одобрена после рецензирования 19.04.2023; принята к публикации 12.05.2023.

Competing interests. The authors declare that they have no competing interests.

Information about the authors

Lyubov I. Bugaeva – Doctor of Biological Sciences, Deputy Director, Head of the Toxicology Laboratory, Scientific Center for Innovative Medicines with Pilot Production, Volgograd State Medical University; Volgograd Medical Research Center, Volgograd, Russia; li_bugaeva@mail.ru

Tatiana D. Denisova – Candidate of Biological Sciences, Senior Researcher at the Laboratory of Toxicology, Scientific Center for Innovative Medicines with Pilot Production, Volgograd State Medical University; Volgograd Medical Research Center, Volgograd, Russia; tanyadennisova@mail.ru

Ivan N. Tyurenkov – Corresponding Member of the Russian Academy of Sciences, Professor, Doctor of Medical Sciences, Head of the Department of Pharmacology and Pharmacy, Institute of Continuing Medical and Pharmaceutical Education, Volgograd State Medical University, Volgograd, Russia; fibfuv@mail.ru

Vladimir I. Petrov – Academician of the Russian Academy of Sciences, Honored Scientist of the Russian Federation, Honored Doctor of the Russian Federation, Doctor of Medical Sciences, Professor, Director, Scientific Center for Innovative Medicines with Pilot Production, Volgograd State Medical University, Volgograd, Russia; brain@sprintnet.ru

Natalia S. Melikhova – Junior Researcher at the Laboratory of Toxicology, Research Center for Innovative Medicines with Pilot Production, Volgograd State Medical University, Volgograd, Russia; bugnatasha7@mail.ru

The article was submitted 13.01.2023; approved after reviewing 19.04.2023; accepted for publication 12.05.2023.