

БЕЗОПАСНОСТЬ НОВЫХ ПРОТЕКТОРОВ ОСТРОЙ ЭКЗОГЕННОЙ ГИПОКСИИ

УДК 616-001.8:615.355

© Д. В. Сосин¹, А. В. Евсеев¹, П. Д. Шабанов²¹ Смоленская государственная медицинская академия Минздрава РФ;² Военно-Медицинская академия им. С. М. Кирова, Санкт-Петербург

Ключевые слова:

металлокомплексные антигипоксанты; острая токсичность; эффективность; терапевтический индекс; мыши.

Резюме:

В статье представлены результаты изучения показателей острой токсичности и безопасности селеносодержащих металлокомплексных соединений $\pi Q1983$, $\pi Q2170$, обладающих высокой эффективностью при коррекции остро нарастающих гипоксических состояний после введения веществ мышам внутрибрюшинно или внутрь. Установлено, что по показателю LD_{50} оба изученных вещества являются высокотоксичными соединениями. В соответствии с величинами средних эффективных доз и расчетами терапевтических индексов вещество $\pi Q1983$ может быть рекомендовано для проведения доклинических исследований.

Известно, что здоровый организм нередко подвергается воздействию экзогенных форм острой гипоксии [9, 14]. Экзогенная гипоксия может возникать в ходе эксплуатации летательных аппаратов, подводных лодок, при отказе систем, обеспечивающих подачу или регенерацию воздуха обитаемых замкнутых пространств [9]. В связи с этим очевидна актуальность проблемы разработки мероприятий по профилактике и лечению последствий формирования в тканях состояния нарастающего кислородного дефицита.

В качестве протекторов острых гипоксических состояний допускается возможность применения фармакологических веществ, способных оказывать модулирующее действие на динамику течения метаболических процессов в тканях, имеющих высокий уровень энергопотребления [2, 3, 9]. Достижения современной фармакологии в данной области медицины нередко подвергаются обоснованной критике в связи с высокой токсичностью многих предлагаемых для изучения антигипоксических средств.

В последнее время реально достижимые перспективы решения проблемы защиты организма от вызываемых острой гипоксией осложнений связывают с веществами металлокомплексной структуры. Молекула такого рода соединения обычно включает в себя какой-либо переходный металл, а также лиганд (один или несколько) биологического происхождения (витамины, биологически активные вещества и близкие к ним по структуре соединения) [13].

Наши ранние исследования показали, что наиболее активными протекторами острых гипоксических состояний из числа изученных металлокомплексов являются 2 вещества под лабораторными шифрами $\pi Q1983$, $\pi Q2170$, содержащие помимо металла (Zn^{2+}) в структуре биологического лиганда атом селена (табл. 1).

Следует отметить, что оба названных соединения на фоне развития у животных острой экзогенной гипоксии проявили себя как истинные антигипоксанты, причем их эффект отмечали не только после внутрибрюшинного (в/б) введения, что характерно для многих известных антигипоксических средств, но также после введения внутрь [7]. В частности, вещества $\pi Q1983$ и $\pi Q2170$, введенные через зонд внутрижелудочно, повышали устойчивость лабораторных животных к острой гипоксии в 2 и более раз [8]. Тем не менее, настораживающим фактом явилось обнаружение случаев гибели мышей на фоне применения указанных веществ, особенно после их в/б введения.

Целью работы явилось получение данных о средних летальных и средних эффективных дозах селеносодержащих металлокомплексных веществ $\pi Q1983$, $\pi Q2170$ для расчета их терапевтических индексов и установления уровня безопасности.

МЕТОДИКА

Опыты выполнены на 78 мышах-самцах линии CBF1 массой 20–30 г. Животных делили на 9 групп по 8–10 мышей в каждой. Первые 4 группы были использованы для определения LD_{50} и ED_{50} после введения вещества $\pi Q1983$ в/б и внутрь. Другие 4 группы использовали для изучения аналогичных эффектов вещества $\pi Q2170$. 9-я группа — являлась группой контроля для изучения выносливости мышей, находившихся в условиях остро нарастающей гипоксии. Перед применением веществ их разводили в 0,3 мл 0,9% р-ра натрия хлорида. Введение внутрь осуществляли через эластичный пластиковый зонд с поперечным сечением 1,5 мм и длиной 15 мм.

Средние летальные (LD_{50}) и средние эффективные (ED_{50}) дозы селеносодержащих металлокомплексных соединений определяли с помощью экспресс-метода В.Б. Прозоровского и соавт. [4]. В ходе исследования после ориентировочной оцен-

■ Таблица 1. Общая структура селеносодержащих металлокомплексных соединений $\pi Q1983$, $\pi Q2170$

Шифр вещества	Металл	Лиганд, модифицированный селеном	Дополнительный лиганд
$\pi Q1983$	Zn ²⁺	3-Гидрокси-2-этил-5-метилпиридин	нет
$\pi Q2170$	Zn ²⁺	Ацетальдегид	Ацетальдегид

ки эффективной дозы вещества каждую группу животных подвергали воздействию 4 или более последовательных доз из числа приведенных в 1-й строке таблицы 2. Указанные дозы соответствовали логарифмам 1,0; 1,1; 1,2; ... 1,9. Выбор шкалы был обусловлен тем, что величины приведенного в ней порядка наиболее часто применяются в практике испытаний лекарственных веществ.

Необходимо подчеркнуть, что реальные дозы могут отличаться от предложенных дозировок в 10, 100, 1000 раз и более. Так, например, дозы 10,0; 12,6; 15,8 ... и т.д. могут быть прочитаны как 1,00; 1,26; 1,58 ... или же — 100; 126; 158 При этом порядок установленных LD₅₀ и ED₅₀ кратно меняется.

Искомые величины и размах их отклонений (пределы ошибки) находили на пересечении горизонтальной строки таблицы, включающей полученный результат, и вертикальной колонки, соответствующей 1-й испытанной дозе.

Уровень летальности во всех группах подопытных животных оценивали спустя 24 ч после введения селеносодержащих металлокомплексных соединений.

Для определения ED₅₀ в качестве тестирующей модели гипоксии был использован широко применяемый в скрининговых исследованиях способ моделирования — острая гипоксия с гиперкапнией (ОГ+Гк) [1]. Инкубационный период (время от мо-

мента введения вещества в организм до момента помещения животного в условия ОГ+Гк) составил 60 мин вне зависимости от способа введения. Антигипоксический эффект вещества констатировали при условии увеличения продолжительности жизни животных, подвергавшихся воздействию ОГ+Гк, не менее чем на 50% в сравнении с группой контроля.

В последующем полученные результаты использовали для расчета так называемого «терапевтического индекса». Терапевтический индекс (LD₅₀/ED₅₀) дает представление о фармакологической широте лечебного действия вещества. Данный показатель был предложен П. Эрлихом в качестве критерия оценки безопасности химического соединения еще в 1913 г. В отличие от показателя LD₅₀, отношение LD₅₀/ED₅₀ позволяет сделать заключение о допустимости применения химического соединения в медицинских целях даже при условии его высокой токсичности [5, 11, 12].

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Началом исследования явилось установление средней летальной и средней эффективной доз вещества $\pi Q1983$ при различных способах его введения.

■ Таблица 2. Параметры ED₅₀ и LD₅₀ и размах отклонений (средних ошибок) при использовании в опыте 4 или 5 пар мышей

Последовательность результатов	ДОЗА, мг/кг									
	10,0	12,6	15,8	20,0	25,0	31,6	39,8	50,1	63,1	79,4
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
(0)0121*	14,6 11–20	18,4 13–25	23,1 17–32	29,0 21–40	36,8 26–50	46,0 33–63	58,0 42–80	73,0 53–100	92,0 67–127	116,0 84–160
(0)0122*	12,9 11–15	16,3 14–19	20,5 18–24	25,8 22–30	32,5 28–38	41,0 35–47	51,5 45–59	65,0 56–75	81,5 71–94	103,0 88–118
0022	14,1 12–17	17,8 16–20	22,4 19–25	28,2 24–32	35,5 31–40	44,7 39–51	56,4 49–64	70,8 62–80	89,0 78–102	112,0 98–127
0111**	17,1 12–25	21,6 15–32	27,2 18–40	34,2 23–51	43,0 29–64	54,2 37–80	68,2 46–101	86,0 58–127	108,0 73–160	136,0 92–202
0112	14,1 11–17	17,8 16–20	22,4 18–27	28,2 23–34	35,5 29–42	44,7 37–53	56,4 47–67	70,8 59–84	89,0 75–106	112,0 84–126
0212	12,9 10–16	16,3 13–20	20,5 17–25	25,8 21–32	32,5 26–40	41,0 33–50	51,5 42–63	65,0 53–80	81,5 66–100	103,0 84–126
1012	13,7 10–19	17,2 13–24	21,8 16–30	27,4 20–38	34,6 25–48	43,5 32–60	54,7 40–75	69,0 50–95	87,0 63–120	109,0 80–150
1022	12,0 10–15	15,0 12–19	19,0 15–24	23,9 19–30	30,0 24–38	37,9 30–47	47,7 38–60	60,0 48–74	75,5 60–95	95,0 76–119
1112**	11,8 8–17	14,8 10–21	18,7 13–27	23,5 16–34	29,6 21–43	37,2 26–54	47,0 33–68	59,0 41–85	74,3 52–107	93,5 65–135

* — оценка LD₅₀ и ED₅₀ проводится по 2-му нулю; 1-й ноль не учитывается, его определение необходимо для отличия от результата 1012; ** — достоверность средних LD₅₀ и ED₅₀ по большей из ошибок $p=0,07$. Достоверность прочих значений LD₅₀ и ED₅₀ < 0,05

Для определения LD_{50} вещества $\pi Q1983$, введенного в/б, субстанцию инъецировали 4 парам мышей в дозах 79,4; 100,0; 126,0 и 158,0 мг/кг. По истечении 24 ч результат составил последовательность 0122, которая отражала летальность животных в соответствующих парах. Согласно данным специализированных таблиц, LD_{50} вещества $\pi Q1983$, введенного парентерально, была 103,0 мг/кг, что, согласно критериям токсичности химических веществ [5, 11, 12], требует отнесения данного соединения к категории высокотоксичных (15–150 мг/кг).

Определение LD_{50} вещества $\pi Q1983$ после введения его внутрь проводилось в дозах 100,0; 126,0; 158,0 и 200,0 мг/кг (4 пары). Спустя 24 ч летальность животных составила последовательность 0022, что, согласно табличным данным, соответствовало дозе 178,0 мг/кг.

Таким образом, анализ результатов исследования по показателю LD_{50} потребовал отнесения вещества $\pi Q1983$ к категории высокотоксичных химических соединений.

С целью установления ED_{50} $\pi Q1983$, вводимого в/б, вещество инъецировали 5 парам мышей (потребовалась дополнительная пара) в дозах 15,8; 20,0; 25,0; 31,6 и 39,8 мг/кг. По завершении периода инкубации (60 мин) животных помещали в условия ОГ+Гк. Ожидаемый антигипоксический эффект (увеличение продолжительности жизни мышей на 50% и более) был зафиксирован в следующей последовательности результатов — 0/0121. В соответствии с данными специализированных таблиц было установлено, что ED_{50} вещества $\pi Q1983$ составляет 29,0 мг/кг, а терапевтический индекс (LD_{50}/ED_{50}) — 3,6.

Для определения ED_{50} $\pi Q1983$, примененного *per os*, вещество вводили 4 парам мышей в дозах 20,0; 25,0; 31,6 и 39,8 мг/кг. По завершении периода инкубации животных помещали в условия гипоксии. Последовательность результатов этой серии опытов составила 0112. Итогом явилось установление средней эффективной дозы вещества $\pi Q1983$, введенного внутрь, — 28,2 мг/кг. Терапевтический индекс в этом случае составил 6,3.

Очередным этапом исследования явилось определение показателей средних летальных и средних эффективных доз вещества $\pi Q2170$ введенного в/б или внутрь.

Установление LD_{50} вещества $\pi Q2170$, примененного в/б, потребовало его введения 4 парам мышей в дозах 39,8; 50,1, 63,1 и 79,4 мг/кг. Через 24 ч летальность животных в этой группе составила последовательность результатов 0022. В соответствии с данными, полученными из специализированных таблиц В. Б. Прозоровского и соавт., было установлено, что LD_{50} для вещества $\pi Q2170$ составляет 56,4 мг/кг.

LD_{50} вещества $\pi Q2170$, введенного мышам внутрь, была изучена также на 4 парах мышей в дозах: 50,1; 63,1; 79,4 и 100,0 мг/кг. Спустя 24 ч летальность животных имела последовательность 0112.

Исходя из табличных данных, LD_{50} при указанном способе введения вещества составила 70,8 мг/кг.

Исходя из полученных результатов, вещество $\pi Q2170$, так же как и вещество $\pi Q1983$, следует отнести к группе высокотоксичных химических соединений. Необходимо отметить, что по уровню токсичности вещество $\pi Q2170$ после в/б введения превосходило вещество $\pi Q1983$ в 1,8 раза, а после введения внутрь — в 2,5 раза.

Для выявления показателя ED_{50} вещества $\pi Q2170$ потребовалось 5 пар мышей для доз 15,8; 20,0; 25,0; 31,6 и 39,8 мг/кг. По завершении периода инкубации и последующих опытов в условиях ОГ+Гк результат составил — 0/0122. Из специализированных таблиц было установлено, что ED_{50} вещества $\pi Q2170$ соответствует 25,8 мг/кг при терапевтическом индексе 2,2.

Определение ED_{50} вещества $\pi Q2170$, введенного внутрь, было выполнено на 4 парах животных в дозировках, аналогичных ранее использованным для в/б введения, а именно — в дозах 15,8; 20,0; 25,0; 31,6 и 39,8 мг/кг. По завершении периода инкубации и воздействия ОГ+Гк последовательность результатов составила 0022. В этом случае ED_{50} была порядка 22,4 мг/кг, а отношение LD_{50}/ED_{50} равнялось 3,1.

Таким образом, выполненные для обоих способов введения веществ расчеты терапевтического индекса вновь подтвердили более высокий уровень токсичности вещества $\pi Q2170$ в сравнении с веществом $\pi Q1983$.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

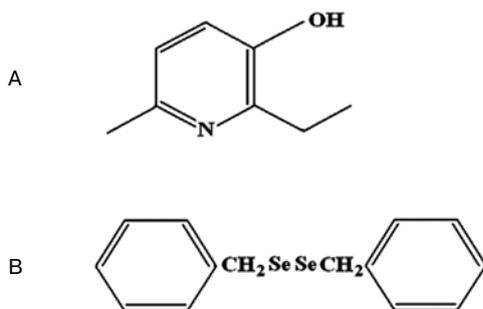
По итогам выполненного исследования вещество $\pi Q2170$, в отличие от вещества $\pi Q1983$, было признано потенциально опасным химическим соединением, что, несмотря на обнадеживающие результаты ранее проведенных исследований, исключает возможность его дальнейшего продвижения в качестве перспективного протектора острых гипоксических состояний.

Как известно, потенциально опасными принято считать химические соединения, способные вследствие своих физических, химических, биологических или токсикологических свойств, оказывать вредное влияние на здоровье людей. Классификация потенциально опасных химических соединений включает в себя: 1) воспламеняющиеся вещества — обычно газы; 2) окисляющиеся вещества — поддерживающие горение или же способствующие воспламенению; 3) горючие вещества — жидкости, газы, пыли, способные самовозгораться; 4) взрывчатые вещества; 5) токсичные вещества — способные в средних смертельных дозах приводить живые организмы к гибели; а также 6) вещества, представляющие опасность для окружающей среды [6]. Таким образом, в соответствии с целью настоящей работы, интерес представляла 5-я позиция классификации.

Выбор метода В. Б. Прозоровского и соавт. для оценки уровня токсичности веществ был обусловлен наличием у него ряда преимуществ в сравнении с классической методикой. В частности, предоставлялась возможность получения удовлетворительных по критерию точности результатов при использовании сравнительно малого количества лабораторных животных. Другим достоинством метода являлась простота процедуры определения показателей LD_{50} и ED_{50} .

Как было установлено, вещества $\pi Q1983$ и $\pi Q2170$ по показателю LD_{50} относятся к категории высокотоксичных химических соединений, представляющих опасность для здоровья человека. Тем не менее, это не может являться категорическим противопоказанием для их возможного применения в медицинских целях. В первую очередь, это касается вещества $\pi Q1983$. Данное заключение основано на сопоставлении показателя LD_{50} с показателем ED_{50} и последующим расчетом терапевтических индексов. Терапевтический индекс вещества $\pi Q1983$ составил 3,6 после парентерального введения и 6,3 после энтерального применения вещества. Известно, что невозможность применения высокотоксичного вещества с лечебной целью внутрь или парентерально по общепринятым стандартам ограничивается терапевтическим индексом 3 и менее [5]. Последнее позволяет отнести вещество $\pi Q1983$ к группе перспективных для исследования антигипоксантов и продолжить изучение его фармакологических свойств.

Следует отметить, что в химическом отношении вещество $\pi Q1983$ [7] — гексакис (3-гидрокс и-2-этил-6-метилпиридинато) [трис (дибензилдисульфидо)] дицинк (II) пентадекасемигидрат представляет собой комплексное соединение замещенного 3-гидрокси-2-этил-6-метилпиридина и диорганодихалькогенида, содержащего в качестве переходного металла Zn^{2+} . В настоящий момент, авторская заявка на изобретение, поданная в Федеральную службу по интеллектуальной собственности, патентам и товарным знакам, зарегистрирована и получила положительное решение. Формула вещества $\pi Q1983$: $[Zn(II)]_2A_6B_3 \cdot 15,5H_2O$ (рис. 1).



■ Рисунок 1. Элементы «А» и «В» в составе молекулы селенсодержащего металлокомплексного (Zn^{2+}) соединения $Q1983$: $[Zn(II)]_2A_6B_3 \cdot 15,5H_2O$

В свою очередь вещество $\pi Q2170$, при экспериментально доказанном и подтвержденном показателями LD_{50} высоком уровне его токсичности, имело относительно низкие терапевтические индексы — 2,2 (в/б) и 3,1 (внутри). Тем не менее, интересно отметить, что и для вещества $\pi Q2170$ уровень безопасности был выше после его введения внутрь, в сравнении с внутрибрюшинным способом введения.

ВЫВОДЫ

Вещество $\pi Q2170$ является потенциально опасным химическим соединением, что исключает возможность его дальнейшего продвижения в качестве потенциального протектора острых гипоксических состояний.

Вещество $\pi Q1983$ после внутрибрюшинного введения и введения внутрь, несмотря на высокие показатели острой токсичности (LD_{50}), согласно рассчитанным терапевтическим индексам — 3,6 (внутрибрюшинно) и 6,3 (per os), может быть рекомендовано для последующих доклинических исследований.

ЛИТЕРАТУРА

1. Методические рекомендации по экспериментальному изучению препаратов, предлагаемых для клинического изучения в качестве антигипоксических средств / Под ред. Л. Д. Лукьяновой. — М., 1990. — 19 с.
2. Неотложная медицинская помощь: Пер. с англ. / Под ред. Дж. Э. Тинтинalli, Р. Л. Кроума, Э. Руиза. — М.: Медицина, 2001. — 1033 с.
3. Новиков В. Е., Понамарева Н. С., Коханов К. В. Влияние антигипоксантов на потребление кислорода животными при черепно-мозговой травме // Эксперим. клинич. фармакология. — 2008. — № 1. — С. 46–48.
4. Прозоровский В. Б., Прозоровский М. П., Демченко В. М. Экспресс метод определения средней дозы и её ошибки // Фармакол. токсикология — 1978. — № 4. — С. 497–502.
5. Руководство по экспериментальному (доклиническому) изучению новых фармакологических веществ / Под общ. ред. Р. У. Хабриева. 2-е изд. — М.: ОАО «Медицина», 2005. — 832 с.
6. Система стандартов безопасности труда. Вредные вещества: классификация и общие требования безопасности. — ГОСТ 12.1.007–76.
7. Сосин Д. В., Парфёнов Э. А., Евсеев А. В. и др. Антигипоксическое средство // Заявка на патент № 2011148565 (072836) от 29.11.11. — Положительное решение от 27.06.12.
8. Сосин Д. В., Евсеев А. В., Парфенов Э. А., Правдивцев В. А., Шабанов П. Д. Антигипоксическое действие металлокомплексных селенсодержащих веществ при различных способах введения // Всест. Смоленской гос. мед. академии. — 2012. — № 2. — С. 34–40.
9. Шабанов П. Д., Зарубина И. В., Новиков В. Е., Цыган В. Н. Метаболические корректоры гипоксии. Под ред. А. Б. Белевитина. — СПб.: Информ-Навигатор, 2010. — 912 с.
10. Fleming D. O., Hunt D. L. Biological Safety: principles and practices. — Washington, DC: ASM Press. — 2000. — 267 p.
11. Gable R. S. Acute toxicity of drugs versus regulatory status / J. M. Fish (Ed.) // Drugs and Society: U. S. Public Policy. — Rowman & Littlefield Publishers, 2006. — P. 149–162.

12. *Katzung B. G., Trevor A. J., Masters S. B.* Katzung & Trevor's Pharmacology Examination & Board Review. 9th edition. — McGraw-Hill Lange, 2010. — 640 p.
13. *Parfenov E. A., Zaikov G. E.* Biotic Type Antioxidants: The Perspective Search Area of Novel Chemical Drugs // PSV. — Utrecht–Boston–Tokyo, 2000. — P. 559.
14. *Rabalais N., Turner R. E., Justic D.* et al. Characterization of Hypoxia: Topic 1. Report for the Integrated Assessment on Hypoxia in the Gulf of Mexico. Ch. 3 // NOAA Coastal Ocean Program, Decision Analysis Series. — 1999. — N15. — 185 p.

SAFETY OF NEW SUBSTANCES WITH PROTECTIVE ACTIVITY IN ACUTE EXOGENOUS HYPOXIA

Sosin D. V., Yevseyev A. V., Shabanov P. D.

◆ **Summary:** In the article are represented results of both acute toxicities and safety determination of selenium-containing metal-complex substances π Q1983, π Q2170 that have high pharmacological activities in acute exogenous hypoxia after their intraperitoneal or enteral introductions in mice. According with established parameters LD_{50} the couple of studied substances must be referred to the category of high toxic chemical agents. However, substance π Q1983 can be recommended for its preclinical investigation because it has enough permissible parameters of ED_{50} and therapeutic indexes.

◆ **Key words:** metal complex substances; acute toxicity; activity; therapeutic index; mice.

◆ Информация об авторах

Сосин Денис Владимирович — к.м.н., доцент кафедры нормальной физиологии. ГБОУ ВПО «Смоленская государственная медицинская академия» Минздравсоцразвития РФ. 214019, Смоленск, ул. Крупской, д. 28. E-mail: hypoxia@yandex.ru.

Евсеев Андрей Викторович — д.м.н., профессор, профессор кафедры нормальной физиологии. ГБОУ ВПО «Смоленская государственная медицинская академия» Минздравсоцразвития РФ. 214019, Смоленск, ул. Крупской, д. 28. E-mail: hypoxia@yandex.ru

Шабанов Петр Дмитриевич — д.м.н., профессор, заведующий кафедрой фармакологии Военно-медицинской академии им. С.М. Кирова. 194044, Санкт-Петербург, ул. Акад. Лебедева, д. 6. E-mail: pdshabanov@mail.ru.

Sosin Denis Vladimirovich — PhD (Physiology, Pharmacology), Assistant Professor, Dept. Of Normal Physiology, Smolensk State Medical Academy. 214019, Smolensk, Krupskaya St., 28. E-mail: hypoxia@yandex.ru.

Yevseyev Andrey Viktorovich — D.Sci. (Pharmacology, Physiology), Professor, Dept. of Normal Physiology, Smolensk State Medical Academy. 214019, Smolensk, Krupskaya St., 28. E-mail: hypoxia@yandex.ru

Shabanov Petr Dmitriyevich — D.Sci. (Pharmacology), Professor and Head, Dept. of Pharmacology, S. M. Kirov Military Medical Academy. 194044, St.-Petersburg, Acad. Lebedev St., 6. E-mail: pdshabanov@mail.ru.