

И.А. Мазур¹, Н.А. Волошин¹, Е.А. Григорьева¹, И.Ф. Беленичев¹, М.Б. Вовченко¹, Л.И. Кучеренко²,
А.А. Светлицкий¹, С.В. Чугин¹

Доклиническое исследование эмбриотоксичности и тератогенности препарата Лизиний

¹Запорожский государственный медицинский университет,

²НПО «Фарматрон», г. Запорожье

Ключевые слова: лекарственное средство Лизиний, эмбриотоксичность, тератогенность.

В эксперименте на крысах с датированным сроком беременности проведено изучение безвредности инъекционного раствора Лизиния, который вводили 1 раз в сутки беременным самкам внутривбрюшинно в терапевтической или промежуточной дозе с 1 по 6; с 6 по 16; с 16 по 20 день беременности. Установлено, что новый оригинальный препарат Лизиний для инъекций, вводимый внутривбрюшинно в терапевтической и промежуточной дозе в различные триместры беременности не оказывает эмбриотоксического и тератогенного действия.

Доклінічні дослідження ембріотоксичності та тератогенності препарату Лізиній

І.А. Мазур, М.А. Волошин, О.А. Григор'єва, М.Б. Вовченко, І.Ф. Беленічев, Л.І. Кучеренко, А.О. Світлицький, С.В. Чугін

В експерименті на щурах з датованим терміном вагітності проведено вивчення нешкідливості ін'єкційного розчину Лізинію, який вводили: 1 раз на добу вагітним самицям внутрішньоочеревинно в терапевтичній або проміжній дозі, з 1 до 6; з 6 до 16; з 16 до 20 дня вагітності. Встановлено, що новий оригінальний препарат Лізиній для ін'єкцій, введений внутрішньоочеревинно в терапевтичній або проміжній дозі, в різні триместри вагітності, не має ембріотоксичної та тератогенної дії.

Ключові слова: лікарський засіб Лізиній, ембріотоксичність, тератогенність.

Патологія. – 2011. – Т.8, №2. – С. 85–88

Preclinical investigation of embriotoxic and teratogenic effect of «Liziniy»

I.A. Mazur, M.A. Voloshyn, O.A. Grygorieva, M.B. Vovchenko, I.F. Belenichev, L.I. Kucherenko, A.O. Svitlitskiy, S.V. Chugin

In experiment on pregnant rats safety of "Lisiniy" injection was studied, which was administrated daily intraperitoneally to pregnant rats in intermediate or therapeutic dose during 1–6, 6–16 and 16–20 days of pregnancy. It is settled that solution "Liziniy" which was injected intraperitoneally in intermediate or therapeutic dose during different periods of pregnancy did not cause embriotoxic or teratogenic effect.

Key words: medicine «Liziniy», embriotoxicity, teratogenity.

Pathologia. 2011; 8(2): 85–88

Эндотелиальная дисфункция является одним из ведущих патогенетических звеньев сердечно-сосудистых заболеваний [1–4]. Роль дисфункции эндотелия доказана в патогенезе ряда наиболее распространенных заболеваний и патологических состояний: церебральном ишемическом инсульте, атеросклерозе, артериальной гипертензии, легочной гипертензии, сердечной недостаточности, дилатационной кардиомиопатии, ожирении, гиперлипидемии, сахарном диабете, гипергомоцистеинемии и др. [1,2,5–7]. Для фармакологической коррекции эндотелиальной дисфункции при гипертонической болезни, ишемической болезни сердца, хронической сердечной недостаточности применяют препараты из группы антагонистов кальция, ингибиторов АПФ, а также, с определенным успехом, блокаторов ангиотензин-2 рецепторов [2,3,7–9]. Однако сложность коррекции эндотелиальной дисфункции заставляет искать новые, более действенные способы фармакокоррекции, особенно в акушерско-гинекологической практике при фетоплацентарной недостаточности и развитии гестозов [10]. Научные исследования в области создания эндотелиопротективных средств указывают на перспективность использования препаратов лизина.

Все вышеизложенное стало обоснованием для создания группой запорожских ученых под руководством академика АТК профессора И.А. Мазура принципиально нового отечественного лекарственного средства оригинальной структуры – L-лизиния 1,2,4-триазолил-5-тиоацетата, проявляющего нейропротективное, ноотропное, кардиопротективное, эндотелиотропное, противоишемическое, антиоксидантное, противовоспалительное действие и обладающего низкой токсичностью [11,12]. Согласно методическим рекомендациям Государственного Фармакологического Центра МОЗ Украины, для разрешения клинических исследований новых препаратов [13] необходимо провести изучение их эмбриотоксичности и тератогенности. Это определило проведение исследований на предмет отсутствия тератогенных и эмбриотоксичных свойств нового метаболитотропного кардиопротектора с выраженными эндотелиопротективным эффектом Лизиния.

Цель работы

Изучить эмбриотоксическое и тератогенное действие Лизиния (раствор для инъекций) в соответствии с методическими рекомендациями Фармакологического Центра МОЗ Украины.

Материалы и методы исследования

Эксперименты проведены на 180 беспородных белых крысах самках (поставщик крыс «Биомодельсервис», г. Киев) массой 160–180 г, содержащихся в оптимальных условиях вивария, согласно методических рекомендаций [13,14]. При работе с экспериментальными животными руководствовались «Европейской конвенцией по защите позвоночных животных, которые используются в экспериментальных и других научных целях» (Страсбург, 18.03.1986). Крыс с датированным сроком беременности получали при помощи способа влагалитных мазков. Использовали 2 дозы 2,5% инъекционного раствора: терапевтическую (эффективную) и промежуточную. Вводимую внутривентриально дозу инъекционного раствора рассчитывали с учетом максимально допустимых объемов жидкости, вводимых внутривентриально животным в период беременности [13]. Инъекционный 2,5% раствор Лизиния, в зависимости от группы наблюдения, вводили 1 раз в сутки беременным самкам внутривентриально в терапевтической (50 мг/кг) или промежуточной дозе (250 мг/кг): с 1 по 6 (период предимплантационного развития); с 6 по 16 (период плацентации и органогенеза); с 16 по 20 день беременности (плодный период развития). Контрольные группы самок получали в эти же сроки внутривентриально физиологический раствор. Всего изучено 9 групп животных.

При оценке эмбриотоксического действия исследуемых препаратов производили ежедневное наблюдение за состоянием беременных крыс. На 20–21 день беременности под эфирным наркозом, после эктаназии животных путем дислокации шейных позвонков производили вскрытие брюшной полости и рогов матки. После лапаротомии выделяли рога матки с яйцниками, переносили их в чашку Петри с физиологическим раствором и учитывали следующие показатели: количество желтых тел беременности, количество живых, мертвых и резорбированных плодов. С помощью бинокулярной лупы проводили тщательный осмотр яйчников. На основании данных экспериментов рассчитывали в процентах следующие параметры: а) общую эмбриональную смертность; б) доимплантационную смертность; в) постимплантационную смертность. Для оценки видимых аномалий развития, плоды, освобожденные от плодных оболочек, переносили в чашку Петри с физиологическим раствором и изучали с помощью бинокулярной лупы. Исследования состояния внутренних органов плода проводили по методу Дж. Вильсона в модификации И.Р. Барилея. Полученные результаты фотодокументировали камерой «OLYMPUS» с разрешением 5 мегапикселей.

Статистическую обработку результатов проводили методами математической статистики с применением пакетов прикладных программ «Биостатистика для Windows, версия 6.0» и «Microsoft Excel 2003». Нормальность распределения проверяли с использованием теста Колмогорова-Смирнова [15]. При условии соответствия нормальности распределения достоверность полученных различий сопоставляемых величин оценивали с исполь-

зованием *t*-критерия Стьюдента. Достоверными считали отличия с уровнем значимости более 95% ($p \leq 0,05$).

Результаты и их обсуждение

После введения Лизиния беременным самкам внутривентриально в терапевтической и промежуточной дозе с 1 по 6 дни беременности яйцники, как и в контроле, имели вид грозноподобных образований, в которых хорошо определяются желтые тела. На вид желтые тела диаметром 1–3 мм, круглой формы, бледно-розового цвета, влажные, блестящие. Количество желтых тел составляло от 6 до 9, в контроле – от 4 до 12. Места плацентации представляют собой белесоватые уплотнения, слегка приподнятые над слизистой стенкой рогов матки, более или менее равномерно удаленные друг от друга, их диаметр в среднем составлял 6–10 мкм. В некоторых случаях в центре мест плацентации просматриваются расширенные кровеносные сосуды как в контроле, так и в эксперименте. Места резорбции имели вид уплотнений черного цвета размерами с маковое зерно до 5–6 мм. На поздних этапах резорбции эмбриональные тела приобретали расплавленный характер и черно-зеленый цвет. Уровень доимплантационной смертности в эксперименте, в зависимости от сроков введения препарата и дозы, колебался в пределах 3,9–12,5%, что на уровне контрольных значений (4,74–11,41%). Постимплантационная смертность, в зависимости от сроков введения препарата и дозы, составляет в эксперименте 0,78–1,35%, что в пределах значений контрольных групп (1,25–2,21%). Общая смертность после применения Лизиния в дозе 50 мг/кг 5,19–12,50%, не выходит за рамки показателей контрольных групп крыс (6,84–13,42%).

В группе крыс, которым раствор Лизиния вводили в дозе 250 мг/кг, доимплантационная смертность находится в пределах 6,32–11,30%, показатель постимплантационной смертности – 1,02–2,45%, а показатель общей эмбриональной смертности – 8,62–12,30%. Все показатели не превышают уровни значений указанных показателей в контрольных группах крыс. В экспериментальных группах наибольшие значения показателя общей эмбриональной смертности определяются у крыс, которым препарат вводили в дозе 250 мг/кг с 6 по 16 сутки беременности. В этих же экспериментальных группах определяются и более высокие значения показателя доимплантационной смертности. Так как первый период беременности – это период зачатия и завершения плацентации, этот период является наиболее чувствительным к повреждающим факторам. Характерным признаком предимплантационного периода развития (1–6 день беременности) является отсутствие морфологической связи между эмбрионом и репродуктивными органами матери. Обнаруживаемые отклонения эмбриогенеза от нормы являются, как правило, суммарным выражением косвенного или прямого действия патогенного фактора. Наибольшие показатели доимплантационной смертности характерны для после введения препарата в дозе 250 мг/кг во втором периоде беременности. Так как препарат вводили после плацентации, более высокие показатели доимплантационной смертности, по срав-

нению с первым периодом беременности, возможно, объяснить влиянием независимых факторов. Вероятно, репродуктивные потери были связаны с сезонностью, так как эти группы животных исследовали в наиболее холодный период года – январь, февраль.

Постимплантационная смертность определяется количеством резорбций. У самок, получавших терапевтическую и промежуточную дозу препарата во втором периоде беременности, по сравнению с контролем и другими группами наблюдается тенденция уменьшения количества желтых тел, мест плацентаций и живых плодов. Показатели постимплантационной смертности во всех экспериментальных группах, независимо от дозы введенного препарата, не превышают контрольных значений.

Плаценты в группах крыс, получавших препарат в дозе 250 мг/кг, имели белесоватый налет, были более сплюснуты и крупнее, чем в норме, что указывает на компенсаторно-приспособительные реакции, происходящие в плаценте при действии факторов различной природы [16,17]. По данным специальной литературы известно, что в период органогенеза и плацентации (6–16 дни беременности) действие повреждающих факторов обычно вызывает уродства органов и систем, что связано с тем, что у различных закладок органов не совпадают периоды усиленной дифференцировки и повышенного обмена веществ [13,16]. При внешнем макроскопическом изучении строения тела конечностей и внутренних органов плодов после введения препарата самкам во всех группах выявлена одна аномалия развития (гидронефроз левой почки плода крысы после введения препарата в дозе 250 мг/кг с 6 по 16 сутки беременности), что составляет 0,11% и находится на уровне спонтанного возникновения аномалий развития в группе обобщенного лабораторного контроля (0,17%) и данных других исследований [16,18].

Выявленное статистически незначимое уменьшение размеров плодов после применения препарата в промежуточной дозе в первом и втором периоде беременности и уменьшение размеров трубчатых костей у плодов не сказывается на их постнатальном развитии. Установленную тенденцию к уменьшению продольных размеров конечностей плодов во всех экспериментальных группах крыс можно рассматривать как слабо выраженное токсическое действие препарата, что описано в медицинской литературе при действии различных факторов во время беременности [16,18].

Согласно схеме оценки выраженности эмбриотоксического действия веществ по характеру установленных нарушений (А,Б), величине вводимой дозы (Т,В.), статистической значимости установленных результатов по отношению к контролю (1,2,3,4); выявленные в эксперименте единичные аномалии развития почек (гидронефроз) и замедление процессов оссификации костей у плодов после введения препарата в промежуточной дозе соответствуют по степени выраженности эмбриотоксического действия БВ3 степени, т. е. Лизиний относится к группе препаратов, не обладающих эмбриотоксичностью.

Таким образом, внутрибрюшинное введение препарата Лизиний в дозе 50 мг/кг и 250 мг/кг беременным самкам крыс не оказывает эмбриотоксического, тератогенного действия и может быть рекомендован к клиническим исследованиям.

Выводы

Новый оригинальный метаболитотропный кардиопротектор Лизиний для инъекций, вводимый внутрибрюшинно в терапевтической и промежуточной дозе (с 1 по 6; с 6 по 16; с 16 по 20 сутки беременности), не вызывает увеличения показателей доимплантационной, постимплантационной и общей эмбриональной смертности плодов по сравнению с контролем.

Малотоксичный препарат Лизиний относится к группе лекарственных средств, не обладающих эмбриотоксичностью и тератогенностью, т. к. проведенное исследование показало отсутствие у него эмбриотоксического эффекта.

Исследование безвредности нового оригинального малотоксичного метаболитотропного кардиопротектора Лизиний показало, что исследуемый препарат не оказывает эмбриотоксического и тератогенного действия и может быть рекомендован к клиническим исследованиям.

Литература

1. Амосова Е.Н. Метаболическая терапия повреждений миокарда, обусловленного ишемией: Новый подход к лечению ишемической болезни сердца и сердечной недостаточности / Е.Н. Амосова // Укр. кардиол. журн. – 2000. – №4. – С. 86–92.
2. Волошин П.В. Эндотелиальная дисфункция при церебральной патологии / Волошин П.В., Малахов В.А., Завгородняя А.Н. – Харьков, 2006. – 93 с.
3. Малая Л.Т. Эндотелиальная дисфункция при патологии сердечно-сосудистой системы / Л.Т. Малая, А.Н. Корж, Л.Б. Балковая. – Х.: Торсинг, 2009. – 432 с.
4. Endotheliotropic action resveratrol at L-NAME-induced endothelial dysfunction / V.I. Kochkarov, T.G. Pokrovskaya // Fundamental pharmacology and pharmacy – clinical practice: Materials of the Russian – Chinese international scientific conferences on pharmacology. – Perm, 2006. – P. 98–106.
5. Дзяк Г.В. Современные подходы к лечению пациентов с артериальной гипертензией и ишемической болезнью сердца / Г.В. Дзяк, А.А. Ханюков // Здоров'я України. – 2009. – №20 (225). – С. 33–35.
6. Коваленко В.М. Виконання державної програми боротьби з гіпертензіями в Україні / В.М. Коваленко, В.М. Корнацький // Укр. кардіол. журн. – 2010. – №12. Режим доступу до журн.: <http://www.ukrcardio.org/journal.php/article/539>.
7. Сіренко Ю.М. Артеріальна гіпертензія та супутня патологія / Ю.М. Сіренко // Донецьк, 2010. – 383 с.
8. Белоусов Ю.Б. Клиническая фармакология и фармакотерапия / Белоусов Ю.Б., Моисеев В.С., Лепахин В.К. – М.: УНИВЕРСУМ ПАБЛИЦИНГ, 1997. – 530 с.
9. Метаболитотропные препараты / И.А. Мазур, И.С. Чекман, И.Ф. Беленичев [и др.]. – Запорожье, 2007. – 309 с.
10. Рекомендації Української Асоціації кардіологів з профілактики та лікування артеріальної гіпертензії. Посібник до Національної програми профілактики і лікування артеріальної гіпертензії. – К.: ПП ВМБ, 2008. – 80 с.
11. Пат. Российской Федерации №21370492 СО7Д, А61К 31/41 Лизиний 3-метил-1,2,4-триазаолил-5-тиоацетат (М-1), проявляющий нейропротективное, ноотропное, кардиопротективное, эндотелиотропное, противоише-

- мическое, антиоксидантное противовоспалительное и противогипоксическое действие / И.А. Мазур, И.Ф. Беленичев, Ю.М. Колесник, А.В. Абрамов, Л.И. Кучеренко, И.С. Чекман, Н.А. Волошин, Н.А. Горчакова – Заявлено 04.06.2007. – Опубл. 20.10.2009.
12. Беленичев И.Ф. Некоторые аспекты эндотелиопротективного и метаболитотропного кардиопротектора «Лизиний» / И.Ф. Беленичев, Н.В. Бухтиярова, Ю.М. Колесник, И.А. Мазур / Фармация України. Погляд у майбутнє: Мат. VII Нац. з'їзду фармацевтів України, Харків, 15–17 вересня 2010. – С. 114–115.
13. Доклінічні дослідження лікарських засобів: Метод. реком. / За ред. член-кор. АМН України О.В. Стефанова. – К.: Авицена, 2001. – 528 с.
14. Науково-практичні рекомендації з утримання лабораторних тварин та роботи з ними / Ю.М. Кожемякін, О.С. Хромов, М.А. Філоненко [та ін.]. – К., 2002. – 155 с.
15. Ланач С.Н. Статистические методы в медико-биологических исследованиях с использованием Excel / Ланач С.Н., Губенко А.В., Бабич П.Н. – К.: Морион, 2001. – 407 с.
16. Абрамченко В.В. Перинатальная фармакология / Абрамченко В.В. – СПб.: Логос, 1994. – 178 с.
17. Милованов А.П. Патология системы мать-плацента-плод / А.П. Милованов. – М.: Медицина, 1999. – 449 с.
18. Hossaini A. Apparent hydronephrosis as a normal aspect of renal development in late gestations of rats: the effect of Methyl Salicylate / A. Hossaini, M. Dalgard, A. Marie // Reproductive Toxicology. – 2001. – Vol. 15, №5. – P. 537–543.

Сведения об авторах:

Мазур И.А., д. фарм. н., профессор, зав. каф. фармацевтической химии ЗГМУ.
Волошин Н.А., д. мед. н., профессор, зав. каф. анатомии человека, оперативной хирургии и топографической анатомии ЗГМУ.
Григорьева Е.А., д. мед. н., доцент каф. анатомии человека, оперативной хирургии и топографической анатомии ЗГМУ.
Беленичев И.Ф., д. биол. н., профессор, зав. каф. фармакологии и медицинской рецептуры ЗГМУ.
Вовченко М.Б., к. мед. н., ст. преподаватель каф. анатомии человека, оперативной хирургии и топографической анатомии ЗГМУ.
Кучеренко Л.И., д. фарм. н., доцент каф. фармацевтической химии ЗГМУ.
Светлицкий А.А., к. мед. н., ассистент каф. анатомии человека, оперативной хирургии и топографической анатомии ЗГМУ.
Чугин С.В., к. мед. н., ассистент каф. анатомии человека, оперативной хирургии и топографической анатомии ЗГМУ.

Адрес для переписки:

Чугин С.В. 69035, г. Запорожье, пр-т Маяковского, 26, ЗГМУ. Тел.: (061) 233 33 56. E-mail: chugins@mail.ru

УДК 612.015.81:612.018.2:612.173-092.9

І.В. Гончар, О.П. Нещерет

Роль оксиду азоту в модуляції метаболічних ефектів адреналіну й інсуліну в міокарді

Інститут ендокринології та обміну речовин НАМН України, м. Київ

Ключові слова: оксид азоту, міокард.

Оксид азоту (NO), крім відомих судинних вазодилаторних ефектів, відіграє важливу роль в аутокринній регуляції функції серця – скоротливості міокарда, частоти скорочень серця, споживання кисню міокардом. Продемонстровано участь NO в модуляції скорочувальної відповіді серця на адренергічну стимуляцію, встановлено взаємодію між катехоламін/сАМР та NO/сGMP залежними шляхами, залучення останніх у вазодилаторний ефект інсуліну. Питання про роль NO як метаболічного модулятора в різних органах і тканинах, зокрема в міокарді, залишається об'єктом досліджень.

Мета роботи: визначити участь NO в модуляції метаболічних ефектів катехоламінів і роль в інсулінозалежному транспорті глюкози в міокарді.

Експерименти виконано на безпородних собаках без розтину грудної порожнини під хлоралозним наркозом із застосуванням катетеризації та екстракорпоральної перфузії басейну огинаючої гілки лівої вінцевої артерії, катетеризації і дренажу вінцевого синусу. В артеріальній крові, що притікає до міокарда, і венозній, що відтікає від нього, визначали вміст енергетичних субстратів. Поглинання їх міокардом оцінювали за різницею вмісту субстрату в артеріальній і венозній крові за умов фіксованого потоку крові (вінцева АВР концентрацій). Для вивчення ролі NO у загальній інтегративній відповіді міокарда на зовнішнє збудження використовували

блокатор NO-синтази – L-NAME (внутрішньокоронарна інфузія 2 мг/хв).

Регіонарна інфузія блокатора не викликала системних зрушень концентрацій досліджуваних метаболітів. При гострій адренергічній стимуляції серця (адреналін 5 мкг, внутрішньокоронарно) за умов інгібування NO-синтази змінювалась структура поглинання субстратів міокардом – відбувалось вивільнення лактату, вільних жирних кислот і гліцерину в кров вінцевого синуса. При введенні інсуліну (1 МО/кг) на фоні блокади NO-синтази екстракція глюкози міокардом, що обчислюється як відношення [АВР концентрацій глюкози] / [концентрація глюкози в артеріальній крові] була меншою під час інсулініндукованого зниження вмісту глюкози в крові.

Висновки. Проведені експерименти свідчать, що NO бере участь у модуляції метаболічних ефектів адреналіну в міокарді й обмежує адренергічну активацію реакцій глікогенолізу та ліполізу. Важливе значення це може мати при надмірній адренергічній стимуляції міокарда й різкому зростанні енергетичних потреб серця. Участь NO-залежних механізмів у регуляції інсуліном транспорту глюкози за відсутності гіпоглікемії не виявлена. Однак при зниженні рівня глюкози в крові і відповідному включенні адренергічних механізмів контррегуляції, оксид азоту залучається до підтримання інсулінстимульованого транспорту глюкози до кардіоміоцитів.