

УДК 615.015.35+615.9:541

ИЗУЧЕНИЕ ХРОНИЧЕСКОЙ ТОКСИЧНОСТИ СУБСТАНЦИИ МОРФОЛИНИЙ 2-[5-(ПИРИДИН-4-ИЛ)-1,2,4-ТРИАЗОЛ-3-ИЛТИО]АЦЕТАТА

И.В. Бушуева, А.И. Панасенко, Е.Г. Кныш,
Запорожский государственный медицинский университет

Бушуева Инна Владимировна – e-mail: valery999@ukr.net

В статье представлены результаты изучения хронической токсичности субстанции морфолиний 2-[5-(пиридин-4-ил)-1,2,4-триазол-3-илтио]ацетата. В экспериментах были использованы белые крысы линии Вистар, прошедшие месячный карантин в виварии. При проведении биохимических исследований у крыс обращает на себя внимание видовая гепатотропность исследуемой субстанции в субтоксической дозе. В дозе 1/20 LD50 и в промежуточной дозе гепатотропного токсического действия не выявлено. Умеренная гиперферментемия обнаружена у крыс, которые получали морфолиний 2-[5-(пиридин-4-ил)-1,2,4-триазол-3-илтио]ацетат в субтоксической дозе. На гистологических препаратах печени патологии не выявлено. Морфологический состав периферической крови не изменялся. Изменений в почках и в моче крыс не обнаружено.

Ключевые слова: хроническая токсичность; субстанция; морфолиний 2-[5-(пиридин-4-ил)-1,2,4-триазол-3-илтио]ацетат; гематологические, биохимические, гистоморфологические исследования; терапевтическая доза.

The article presents the results of a study of chronic toxicity substance morpholinium 2-[5-(pyridin-4-il)-1,2,4-triazole-3-ilthio]acetate. In the experiments, we used white Wistar rats, the past month quarantine in the vivarium. When conducting biochemical studies in rats noteworthy species hepatotropic substance investigated in sub-toxic dose. At a dose of 1/20 LD50 in the intermediate dose hepatotropic toxic effects were observed. Moderate hyperenzymemia observed in rats that received morpholinium 2-[5-(pyridin-4-il)-1,2,4-triazole-3-ilthio]acetate subtoxic dose. On histological preparations of liver pathology vivavleno. Morphological composition of the peripheral blood did not change. Changes in the kidneys and urine of rats were detected.

Key words: chronic toxicness; substantsiya; morpholinium 2-[5-(pyridin-4-il)-1,2,4-triazole-3-ilthio]acetate, haematological, biochemical, histomorphological studies; therapeutic dose.

Введение

Проведение исследований в ряду водорастворимых соединений – производных 1,2,4-триазола, является перспективным направлением для решения проблемы поиска высокоэффективных лекарственных средств как для гуманной медицины, так и для нужд ветеринарии. На сегодняшний день известно, что морфолиний 2-[5-(пиридин-4-ил)-1,2,4-триазол-3-илтио]ацетат является достаточно активным веществом. Дальнейшее внедрение данной субстанции в медицинскую и ветеринарную практику требует углубленных исследований данного соединения [1, 2].

Целью исследования явилось изучение хронической токсичности субстанции морфолиний 2-[5-(пиридин-4-ил)-1,2,4-триазол-3-илтио]ацетата.

Материалы и методы

Изучение хронической токсичности субстанции морфолиний 2-[5-(пиридин-4-ил)-1,2,4-триазол-3-илтио]ацетата проводили согласно Методическим рекомендациям Фармакологического комитета Украины, с учетом модификаций, рекомендованных Всемирной организацией здравоохранения по проведению медико-биологических испытаний в токсикологических исследованиях. Использованы также Методические рекомендации по использованию поведенческих реакций животных в токсикологических исследованиях с целью гигиенического нормирования [3–6]. В экспериментах были использованы белые крысы линии «Вистар», прошедшие месячный карантин в виварии. Все животные были стандартизированы по массе тела, полу, условиям содержания и кормления. После карантина были отобраны животные, достигшие массы 180 г и не отличаю-

щиеся по внешним признакам и поведенческим реакциям. Вес белых крыс колебался от 180 до 220 г и в среднем равнялся 206,8±17,44 г.

Крысы были разделены на серии по 24 особи (12 самок и 12 самцов). Всего было использовано 8 серий – 3 серии для перорального введения данной субстанции, 3 серии для внутрибрюшного введения водного раствора морфолиний 2-[5-(пиридин-4-ил)-1,2,4-триазол-3-илтио]ацетата и 2 контрольные серии.

Учитывая, что срок назначения морфолиний 2-[5-(пиридин-4-ил)-1,2,4-триазол-3-илтио]ацетата для лечения составляет от 15 до 30 дней на курс, продолжительность изучения хронической токсичности соответствовала 24 неделям. Исследуемое вещество вводили ежедневно внутрибрюшинно в виде 1% водного раствора и внутривенно с помощью металлического зонда. Водный 1% раствор морфолиний 2-[5-(пиридин-4-ил)-1,2,4-триазол-3-илтио]ацетата вводился в трех дозах: минимальная терапевтическая доза (20 мкг/кг) – 1-я группа, промежуточная доза (50 мкг/кг) – 2-я группа, субтоксическая доза (100 мкг/кг) – 3-я группа. 4-я группа служила контролем и получала 1 мл изотонического раствора. 5-, 6-, 7-я группы получали препарат per os, 8-я группа была контрольной.

На протяжении всего эксперимента животные ежедневно находились под наблюдением, проводился учет пищи и воды, массы тела и других показателей, характеризующих состояние животных.

Влияние субстанции морфолиний 2-[5-(пиридин-4-ил)-1,2,4-триазол-3-илтио]ацетата на центральную нервную систему (ЦНС) изучали при помощи методики «открытое

поле» [7-10], актографии с электронной регистрацией количества движений животного (крысы), движущегося в клетке спонтанно. Методика с использованием «вращающегося стержня» применялась для определения нейролептического действия, нарушающего координационно-мышечные рефлексы [11]. Вращающиеся стержни использовали после пятидневной тренировки белых крыс. При помощи прибора «ЕКС-01» был изучен порог нервно-мышечного раздражения (реобазы) у крыс. Гексеналовая проба проводилась для определения влияния исследуемой субстанции на скорость микросомального окисления ксенобиотиков в печени.

О белково-синтезирующей функции судили по определению в венозной крови общего белка, альбумина и процентного соотношения белковых фракций до и после приманки животных морфолиний 2-[5-(пиридин-4-ил)-1,2,4-триазол-3-илтио]ацетатом.

Функция печени оценивалась по достижению динамики суточного диуреза, плотности мочи, микроскопии осадка мочи, определению хлоридов натрия и калия, а также мочевины после стандартной водной загрузки (5 мл внутрижелудочно) под влиянием хронического введения морфолиний 2-[5-(пиридин-4-ил)-1,2,4-триазол-3-илтио]ацетата.

Деятельность сердечно-сосудистой системы оценивали по снятой электрокардиограмме во втором стандартном введении по общепринятым амплитудно-временным показателям.

Измерение физиологической температуры проводили электро-термометрично в прямой кишке крыс.

Гематологические, биохимические и гистоморфологические исследования проводили после хронической приманки и сравнивали полученные результаты с данными контрольной группы животных. Тесты реологий выполнялись при помощи методик, рекомендованных И.К. Лакиным.

Артериальное давление систолы определяли при помощи зажима пневмоманжеткой хвостовой артерии у крыс и реографической регистрацией кровотока хвостовой артерии.

Напряжение кислорода в капиллярной крови определяли при помощи прибора фирмы «Radiometr» TCM-2- oxydenmonitor, после предыдущей депиляции шерсти на коже живота крыс. Все биохимические исследования использовались по стандартным рутинным методикам с использованием стандартных наборов реактивов фирмы «Лахема» (Чехия). Гематологические показатели изучались после забора крови из хвостовой вены у фиксированных крыс в капилляре Кочака.

Все исследования проводились на 30-й, 90-й и 180-й день введения 1% водного раствора морфолиний 2-[5-(пиридин-4-ил)-1,2,4-триазол-3-илтио]ацетата. Статистическая обработка данных проводилась с использованием параметрического критерия Стьюдента «t» при помощи непараметрической статистики с использованием критерия Уилкинсона.

Результаты и их обсуждение

При анализе поведенческих реакций через месяц после начала введения крысам морфолиний 2-[5-(пиридин-4-ил)-1,2,4-триазол-3-илтио]ацетата установлено достоверное (критерий U) снижение числа пересекаемых квадратов в сравнении с контрольными животными, которые получали физиологический раствор. В сравнении с показателями начального уровня (таблица 1) выявлены более значительные изменения ($p=0,048$).

ТАБЛИЦА 1.

Поведенческие реакции в начальном состоянии по методу «открытое поле» до эксперимента

Показатель										
	Серия	Число квадратов	Кол-во взглядов	Кол-во осмотров	Кол-во стоков	Кол-во умываний	Пассивное время	Латентное время	Кол-во мочеиспусканий	Кол-во дефекаций
I серия	48,55±0,51	6,33±1,4	2,42±0,3	7,61±1,6	4,3±0,9	44,7±5,2	9,8±5,2	1,6±0,3	3,4±0,3	
II серия	48,62±5,51	6,45±0,91	2,61±0,4	8,32±1,3	6,1±0,7	43,2±3,3	8,5±1,6	1,7±0,3	3,0±0,5	
III серия	57,32±5,31	7,90±1,6	3,06±0,6	8,97±1,4	5,5±3,1	45,0±5,8	9,1±1,5	1,8±0,4	2,6±0,9	
Контроль (плацебо)	50,41±6,62	7,81±0,9	2,01±0,4	9,35±1,3	4,3±0,6	43,6±3,4	9,1±1,1	1,3±0,2	2,6±0,3	

У животных во II и III сериях также происходило уменьшение локомоторной активности по первому показателю в сравнении с первичными данными. Все ориентированные рефлексы у животных III серии имели тенденцию к угнетению. Увеличилось достоверно пассивное время пребывания крыс на поле, что свидетельствует о тормозящем действии на ЦНС субтоксических доз морфолиний 2-[5-(пиридин-4-ил)-1,2,4-триазол-3-илтио]ацетата. Это подтверждается и при исследовании спонтанной двигательной активности (таблица 2) на вращающемся стержне (таблица 3).

ТАБЛИЦА 2.

Результаты актографии у крыс (1 месяц)

Морфолиний 2-[5-(пиридин-4-ил)-1,2,4-триазол-3-илтио]ацетат			Контроль
I серия	II серия	III серия	IV серия
12,3±0,54	10,2±1,91	7,51±0,38	14,43±0,92
12,48±1,11	10,2±1,91	7,32±0,91	13,61±1,22

Примечание: в III серии выявлено достоверное снижение спонтанной двигательной активности ($p=0,048$) (в числителе – внутрижелудочное, в знаменателе – внутрибрюшинное).

ТАБЛИЦА 3.

Результаты удерживания животных на вращающемся стержне (1 месяц)

Морфолиний 2-[5-(пиридин-4-ил)-1,2,4-триазол-3-илтио]ацетат			Плацебо
I серия	II серия	III серия	Контроль IV серия
+/+	+/+	-/+	+/+
+/-	+/+	-/-	+/+
+/+	-/+	+/+	+/-
-/+	+/-	-/+	+/-
+/+	-/+	-/-	+/+
-/+	+/-	+/+	+/+
-/-	-/-	+/+	+/+
+/+	-/+	+/-	-/-
+/+	+/+	-/+	-/+
+/+	+/+	+/+	+/+

Примечание: «-» – количество падений; статистически достоверных отличий не отмечено; (в числителе – внутрижелудочное, в знаменателе – внутрибрюшинное).

Порог реобазы увеличился, что свидетельствует об угнетающем действии на ЦНС субтоксических доз морфолиний 2-[5-(пиридин-4-ил)-1,2,4-триазол-3-илтио]ацетата при хроническом 30-дневном введении. Ректальная температура не изменялась в сравнении между сериями.

При изучении влияния морфолиний 2-[5-(пиридин-4-ил)-1,2,4-триазол-3-илтио]ацетата на амплитудно-временные показатели электрокардиограммы (ЭКГ) у крыс, получающих субтоксические дозы субстанции, происходило некоторое замедление частоты сердечных сокращений. Амплитудных изменений на ЭКГ – депрессии сегмента ST, амплитуда рубцов R и S, не зарегистрировано.

Бромсульфалеиновая проба не отмечалась ни в начале, ни между сериями, что свидетельствует об отсутствии влияния исследуемого вещества в изучаемых дозах на функцию печени и почек исследуемых животных. Уровень артериального давления не изменялся. Не отмечено и достоверных отклонений и в парциальном давлении кислорода в процессе приманки животных при внутрибрюшинном введении субстанции. При биохимических и морфологических исследованиях крови у крыс установлено, что введение морфолиний 2-[5-(пиридин-4-ил)-1,2,4-триазол-3-илтио]ацетата в течение месяца не влияло на суточный диурез и другие показатели анализа мочи и не влияло на электролитический состав плазмы. При исследовании глюкозы, холестерина, мочевины выявлено увеличение показателя холестерина у крыс III серии. Других статистически значимых отклонений от контрольных параметров не наблюдалось.

При изучении биохимических печеночных показателей у крыс установлена тенденция к увеличению тимоловой пробы, общего билирубина ($p=0,049$), что свидетельствует о холестатическом действии морфолиний 2-[5-(пиридин-4-ил)-1,2,4-триазол-3-илтио]ацетата в субтоксической дозе при пероральном введении (таблица 4).

ТАБЛИЦА 4.
Биохимические показатели печеночных проб у крыс

Время	Показатель	Группы животных						Плацебо	
		I серия		II серия		III серия		В/Ж	В/Б
		В/Ж	В/Б	В/Ж	В/Б	В/Ж	В/Б		
1-ый месяц	Тимоловая проба (у. ед.)	2,84±0,35	2,73±0,31	2,61±0,51	2,80±0,63	2,72±0,71	2,54±0,61	2,34±0,71	2,61±0,71
3-ий месяц	Билирубин общий	6,94±0,51	6,80±0,37	6,92±0,63	6,72±0,54	6,71±0,37	7,01±0,74	6,84±0,55	6,72±0,61
6-ой месяц	Билирубин конъюгированный	2,70±0,3	2,64±0,2	2,59±0,5	2,63±0,3	2,71±0,2	2,59±0,3	2,66±0,18	2,71±0,24

Примечание: В/Ж – внутривенно; В/Б – внутрибрюшинно.

У животных III серии происходило некоторое снижение содержания общего белка, содержание оксикортикостероидов не изменялось. Показатели периферической крови у крыс статистически не отличались, что свидетельствует об интактном действии исследуемой субстанции на кроветворение. При исследовании белковых фракций у крыс обращает на себя внимание некоторое повышение содержания гаммафракции глобулинов, что также может отображать гепатотропный характер реакции у животных, которые получали субтоксическую дозу. Содержание общего белка,

липидов в сыворотке и печени крыс достоверно не отличается от контроля (таблица 5).

ТАБЛИЦА 5.
Содержание общих липидов у крыс (30 дней), мг%

	I серия	II серия	III серия	Контроль
Сыворотка	340±32,84/ 335,61±31,06	344,4±24,04/ 351,54±21,40	354,22±31,10/ 349,88±30,17	329,07±37,04/ 330,56±24,84
Печень	6,41±0,61/ 6,32±0,52	6,74±0,52/ 6,84±0,37	6,90±0,64/ 6,59±0,71	6,18±0,54/ 6,37±0,42

Выводы

При проведении биохимических исследований у крыс обращает на себя внимание видовая гепатотропность исследуемой субстанции в субтоксической дозе. В дозе 1/20 ЛД₅₀ и в промежуточной дозе гепатотропного токсического действия не выявлено. Умеренная гиперферментемия обнаружена у крыс, которые получали морфолиний 2-[5-(пиридин-4-ил)-1,2,4-триазол-3-илтио]ацетат в субтоксической дозе. Данный эффект связан, возможно, с нарушением функционирования микросомальных мембран и мембран гепатоцитов, а не с некротическими процессами. На гистологических препаратах печени патологии не выявлено. Быстрота окисления пинетолы с добавлением экстракта печени крыс составила 0,516±0,64 у.е. (контроль – 0,538±0,51 у. ед.). Морфологический состав периферической крови не изменялся. Изменений в почках, моче крыс не обнаружено, что позволяет говорить об отсутствии нефротического эффекта у исследуемой субстанции через 1 месяц приманки животных на протяжении 30 дней.



ЛИТЕРАТУРА

- Олейнич О. Д. Морфолиний 3-(4-пиридил)-1,2,4-триазолил-5-тиоацетат чистий: технические условия. Львов. 2000.
- Olejnych O. D. Morfolinij 3-(4-piridil)-1,2,4-triazolil-5-tioacetat chistij : texnichni umovi. L'viv. 2000.
- Патент Украины на изобретение № 87184 Производные 1,2,4-триазол-3-илтио-ацетатной кислоты, проявляющие антиоксидантную, гепатопротекторную и иммуностимулирующую активность /Кныш Е.Г., Парченко В.В., Панасенко А.И., Каплаушенко А.Г., Маковик Ю.В., Кулиш С.М., Гоцуля А.С., Издепский В.И., Киричко Б.П., Мисик О.Г.; заявитель Панасенко А.И.; заявл. 02.08.2007; опубл. 25.06.2009. Бюл.№ 12.
- Patent Ukrainy na izobretenie № 87184 Proizvodnye 1,2,4-triazol-3-iltio-acetatnoj kisloty, proyavlyayushhie antioksidantnyu, gepatoprotektornuyu i immunostimuliruyushhuyu aktivnost' /Knysh E.G., Parchenko V.V., Panasenko A.I., Kaplaushenko A.G., Makovik Yu.V., Kulish S.M., Goculya A.S., Izdepskij V.I., Kirichko B.P., Misik O.G.; zayavitel' Panasenko A.I.; zayavl. 02.08.2007; opubl. 25.06.2009. Byul. № 12.
- Методические рекомендации по использованию поведенческих реакций животных в токсикологических исследованиях для целей гигиенического нормирования. Киев. 1980. 47 с.
- Metodicheskie rekomendacii po ispol'zovaniyu povedencheskix reakcij zhivotnyx v toksikologicheskix issledovaniyax dlya celej gigienicheskogo normirovaniya. Kiev. 1980. 47 s.
- Фролова А.Д., Дворкин Э.А., Лисман М.Б., Луковникова Л.В., Нецаева Е.Н., Сидорин Г.И. К использованию показателей поведенческих реакций в токсикологическом эксперименте. Гигиена и санитар. 1980. № 8. С. 53-57.
- Frolova A.D., Dvorkin E.A., Lisman M.B., Lukovnikova L.V., Nechaeva E.N., Sidorin G.I. K ispol'zovaniyu pokazatelej povedencheskix reakcij v toksikologicheskomeksperimente. Gigiena i sanitar. 1980. № 8. S. 53-57.
- Clasen R.A., Hartman J.F., Starr A.J. et al. Electron microscopic and chemical studies of the vascular changes and edema of lead encephalopathy. Am. J. Pathol. 1974. V. 74. № 2. P. 215-233.
- Snowdon C.T. Learning deficits in lead-injected rats. Pharmacol. Biochem. Behavior. 1973. V. 1. № 3. P. 599-603.

7. Мельников А.В., Куликов М.А., Навикова М.Р., Шарова Е.В. Изменения спонтанной биоэлектрической активности головного мозга при транскраниальной электрической и электромагнитной стимуляции. Журнал высшей нервной деятельности им. Павлова. 2004. № 5. С. 712–717.

Mel'nikov A.V., Kulikov M.A., Navikova M.R., Sharova E.V. Izmeneniya spontannoj bioelektricheskoj aktivnosti golovnogo mozga pri transkraniальной elektricheskoj i elektromagnitnoj stimulyacii. Zhurnal vysshej nervnoj deyatel'nosti im. Pavlova. 2004. № 5. S. 712–717.

8. Brudzynski S.M., Krol S. Analysis of locomotor activity in the rat: parallelism index, a new measure of locomotor exploratory pattern. *Physiol. Behav.* 1997. V. 62. P. 635-642.

9. Calatayud F., Belzung C., Aubert A. Ethological validation and the assessment of anxiety-like behaviours methodological comparison of classical analyses and

structural approaches. *Behav. Process.* 2004. V. 67. P. 195-206.

10. Yamamoto Y., Mikami A., Fujii Y., Kamel C. Effect of histamine on muscimol-induced working memory deficits in radial maze performance. *Pharmacol Sci.* 2007. V. 104. P. 252–257.

11. Воронина Т.А., Островская Р.У. Методические указания по изучению ноотропной активности фармакологических веществ / Руководство по экспериментальному (доклиническому) изучению новых фармакологических веществ. М. 2000. С. 153-158.

Voronina T.A., Ostrovskaya R.U. Metodicheskie ukazaniya po izucheniyu nootropnoj aktivnosti farmakologicheskix veshhestv. Rukovodstvo po e'ksperimental'nomu (doklinicheskomu) izucheniyu novyx farmakologicheskix veshhestv. M. 2000. S. 153-158.