

УДК 57.084.1

ИССЛЕДОВАНИЕ СУБХРОНИЧЕСКОЙ ТОКСИЧНОСТИ С ОЦЕНКОЙ МЕСТНОРАЗДРАЖАЮЩЕГО ДЕЙСТВИЯ СУБСТАНЦИИ DMAE 7-16

¹Соловьев Н.В., ¹Щуровская К.В., ^{1,2}Жунусов Н.С.,

¹Сазонова В.Е., ¹Черняева С.С., ¹Ефименко С.В.

¹ФГАОУ ВО «Белгородский государственный национальный исследовательский университет»,
Белгород, e-mail: nzhunu@mail.ru;

²Лаборатория генетических технологий и генного редактирования
для биомедицины и ветеринарии, Белгород, e-mail: nzhunu@mail.ru

Исследование субхронической токсичности субстанции DMAE 7-16 проводилось на лабораторных крысах линии Wistar. Дозы рассчитывались с использованием коэффициента пересчёта доз согласно методическим указаниям, находящимся в «Руководстве по экспериментальному (доклиническому) изучению новых фармакологических веществ». Препарат вводили внутривентрикулярно один раз в сутки в течение 2 недель. Перед началом эксперимента животные прошли двухнедельный карантин. Рандомизацию животных проводили по полу и массе тела. На 15-й и 29-й день опыта у крыс проводился забор проб крови для проведения гематологических и биохимических исследований. После эвтаназии животных осуществляли забор органов для последующего морфологического исследования с проведением гравиметрии органов. По результатам гематологического, биохимического исследования крови токсических или других изменений во всех группах животных не выявлено. По результатам гравиметрического, макроскопического и микроскопического исследования внутренних органов крыс, получавших субстанцию DMAE 7-16 в однократной (0,01 г/кг/сут) и четырехкратной (0,04 г/кг/сут) дозах, установлено, что данная субстанция не вызывает дистрофических, воспалительных и иных патологических изменений внутренних органов, в том числе местнораздражающего действия в исследуемых дозах.

Ключевые слова: субхроническая токсичность, токсичность, субстанция, вещества, фармакология

STUDY OF SUBCHRONIC TOXICITY WITH ESTIMATION OF LOCAL IRRITATING EFFECT OF SUBSTANCE DMAE 7-16

¹Solovev N.V., ¹Schurovskaya K.V., ^{1,2}Zhunosov N.S.,

¹Sazonova V.E., ¹Chernyaeva S.S., ¹Efimenko S.V.

¹Belgorod State National Research University, Belgorod, e-mail: nzhunu@mail.ru;

²Laboratory of Genetic Technologies and Gene Editing for Veterinary Medicine and Biomedicine,
Belgorod, e-mail: nzhunu@mail.ru

The study of subchronic toxicity of the substance DMAE 7-16 was carried out on laboratory rats of the Wistar line. The doses were calculated using the dose conversion factor according to the methodological guidelines contained in the "Guidelines for experimental (preclinical) study of new pharmacological substances". The drug was administered intragastrically once a day for 2 weeks. Before the start of the experiments, the animals underwent a two-week quarantine. Animals were randomized according to sex and body weight. On the 15th and 29th days of the experiment, blood samples were taken from the rats for hematological and biochemical studies. After the euthanasia of the animals, organs were harvested for subsequent morphological studies with organ gravimetry. According to the results of hematological, biochemical blood tests, toxic or other changes in all groups of animals were not revealed. According to the results of gravimetric, macroscopic and microscopic examination of the internal organs of rats treated with the substance DMAE 7-16 in a single (0.01 g / kg / day) and fourfold (0.04 g / kg / day) doses, it was found that this substance does not cause dystrophic, inflammatory and other pathological changes in internal organs, including local irritating action in the studied doses.

Keywords: subchronic toxicity, toxicity, substance, drug, pharmacology

Более 10 лет назад Всемирной организацией здравоохранения была собрана, проанализирована и опубликована статистика, представляющая средние показатели распространённости артериальной гипертензии среди населения различных стран по всему миру. Так, было зарегистрировано более 1 млрд (40%) случаев обращений в клиники, связанных с патологией сердечно-сосудистой системы, приводящей к повышенному артериальному давлению.

На фоне ретинопатии чаще возникают окклюзии сосудов сетчатки, что требует экстренной помощи для сохранения зрения. Отсутствие своевременного фармакологического вмешательства приводит к полной или частичной потере зрения и инвалидности.

При артериальном давлении выше 130 мм рт. ст. в нашем организме одним из распространенных органов-мишеней являются глаза, а именно сетчатка. При раз-

витии гипертонической болезни специфические изменения в сетчатке появляются примерно в 66% случаев. Гипертоническая нейроретинопатия опасна тем, что повреждение сосудов сетчатки провоцируют развитие их окклюзии, что требует скорого лечения. При отсутствии медикаментозной терапии ретинопатия нередко вытекает в полную потерю зрения, что может быть обусловлено как дистрофией сетчатки, так и атрофией зрительного нерва.

Все патологии, затрагивающие целостность и нормальное физиологическое состояние микроциркуляторной сосудистой системы глаза, включены в список основных причин возникновения слепоты, что показывает их важную роль в ухудшении зрения вплоть до его потери. Лечение гипертонической нейроретинопатии не имеет направленной терапии на сетчатку и основано только на лечении основной патологии. Несмотря на это, последствия развития гипертонической нейроретинопатии требуют создания препаратов, имеющих строгий вектор направленности, подразумевающий фармакологическое воздействие не только на сетчатку, но и сосуды.

В исследованиях [1, 2] была показана статистика диагностированных ретинопатий: примерно в половине случаев обращений, связанных с заболеванием сетчатки и зрительного нерва, были выявлены ретинопатии, этиологией которых являлось нарушение микроциркуляторной системы глаза. Первостепенными задачами фармакологии в области офтальмотерапии предстают поиск и исследование фармакологически активных веществ, способных предупредить развитие локальных ишемических патологических явлений [3, 4], направленных на коррекцию микрососудистого давления в области глазного яблока [5, 6], а также в иных органах и системах организма [7, 8].

На данный момент химическое соединение с лабораторным шифром DMAE 7–16, полное химическое название которого – 2-диметиламиноэтанол L-2-аминопентандиоат, представляет собой многообещающее решение в качестве основного медикаментозного компонента в лечении заболеваний, связанных с патологией микроциркуляторного русла глазного яблока. Данное вещество способно улучшить исследуемые критерии, состоящие микроциркуляторного русла, электрофизиологическое состояние сетчатки, морфологическую картину [9]. А.А. Пересыпкиной с соавт. было проведено исследование на модели нейроретинопатии с повышенным артериальным давлением, демонстрирующее многообещающую эффективность

вещества DMAE 7–16 [9]. Нейро- и ангиопротективное действие показано наиболее эффективно при применении дозы 25 мг/кг в сутки. Это лучше результатов использования DMAE 7–16 дозировкой 12,5 мг/кг в сутки. Основными критериями оценки эффективности терапии данным соединением явились предотвращение развития нейрональных и сосудистых повреждений в сетчатке в модельной группе по сравнению с контрольной группой, положительное влияние на динамику коэффициента b/a в группах терапии развивающейся патологии – это выражалось восстановлением волны b на ЭРГ [9].

Определение токсических свойств новых соединений является важным компонентом их изучения и анализа возможностей внедрения в терапию определённых патологических состояний. Рост числа осложнений при артериальной гипертензии, атеросклерозе, сахарном диабете требует расширения сегмента глазных лекарственных форм, направленных на лечение не только болезней сосудистой оболочки глаза, но и нейронов сетчатки, гибель которых индуцирована преимущественно ишемическим компонентом данных заболеваний [10].

Цель исследования заключалась в определении субхронической токсичности и местнораздражающего действия субстанции DMAE 7–16.

Материалы и методы исследования

При исследовании субхронической токсичности исследуемую субстанцию под лабораторным шифром DMAE 7–16 вводили в дозах, которые при пересчете с человека на животного составляли однократную и четырехкратную терапевтические дозы. Для пересчета доз с человека на животного использовали коэффициент пересчета доз, указанный в «Руководстве по экспериментальному (доклиническому) изучению новых фармакологических веществ». Введение препарата осуществляли внутрижелудочно один раз в сутки в течение 14 дней.

Исследование субхронической четырнадцатидневной токсичности проводили на самцах и самках белых лабораторных крыс линии Wistar. Рандомизацию осуществляли после двухнедельного периода карантина и адаптации. Животных содержали по шесть в клетке, в комнатах содержания животных соблюдался режим день/ночь длительностью 12 ч, при стандартных температуре и влажности рекомендованных для вивариев. На всем протяжении исследования использовали гранулированный лабораторный корм (сертификат № РОСС RU/П081.В00.365 ГОСТ 50258-92).

Этические принципы обращения с лабораторными животными соблюдались в соответствии с «European Convention for the Protection of Vertebrate Animals used for Experimental and other Scientific Purposes. CETS No. 170». Все материалы исследования задокументированы как первичные данные исследования и находятся в общей папке по исследованию.

В соответствии с указаниями, разработанными Федеральным государственным бюджетным учреждением «Научный центр экспертизы средств медицинского применения» «Руководством по проведению доклинических исследований лекарственных средств», при исследовании были использованы такие методы, как визуальный, инструментальный и лабораторный методы контроля состояния животных, для оценки действия препаратов [11].

Экспериментальные животные были разделены на три группы (по 12 животных в каждой), в соответствии с тремя сериями опытов по изучению субхронической 14-дневной токсичности:

1 группа животных – контрольная (ежедневное внутрижелудочное введение 1% крахмального клейстера);

2 группа животных – DMAE 7–16 в дозе 0,01 г/кг/сут;

3 группа животных – DMAE 7–16 в дозе 0,04 г/кг/сут.

Было проведено определение основных характеристик у животных по окончании карантина, длящегося 14 дней, и их адаптации к новым условиям. Рассматривались масса тела, ритмичность дыхания, двигательная активность, тестировались поведенческие реакции, оценивалось потребление воды и пищи, проводился визуальный осмотр состояния слизистых, кожного покрова, волосяного покрова, рассматривалась реакция на внешние раздражители. Исследование длилось 28 дней: первый этап включал применение субстанции в течение первых двух недель, после которого оставшиеся две недели животные находились под наблюдением без применения препаратов.

При этом еженедельно контролировали основные показатели для оценки общего состояния животных.

Все манипуляции с животными проводились с применением наркоза. На 15-й и 29-й день эксперимента у животных проводился забор проб крови для проведения гематологических и биохимических исследований. Сразу после эвтаназии животных осуществлялась некропсия с последующим гравиметрическим анализом органов, а также забор органов и тканей для последующего морфологического исследования.

Биохимическое исследование крови проводили на анализаторе Olympus AU 640, выявлялись биохимические параметры, отвечающие за повреждение внутренних органов. Забор проб крови проводили после введения препарата в течение 14 дней, и после 14-дневного периода отмены препарата. С помощью гематологического анализатора CELL-DYN 3700 проводили анализ крови на содержание гемоглобина, эритроцитов, тромбоцитов и лейкоцитов, определяли лейкоцитарную формулу.

Полученные данные были выборочно обработаны с помощью компьютерных программ Microsoft Excel 2019 и Statistica 10 (StatSoft, США). Были применены основные описательные статистики: среднее, стандартная ошибка средней. Для сравнения средних количественных показателей между группами использовали t-аспект Стьюдента для независимых групп или критерий Манна – Уитни (U-тест) в зависимости от типа распределения показателей (нормальное / ненормальное). Достоверные различия принимались при $p < 0,05$.

Результаты исследования и их обсуждение

После 14-дневного внутрижелудочного введения соединения DMAE 7–16 в исследуемых дозах не было выявлено влияния соединения на содержание гемоглобина в крови. Также во всех группах было обнаружено нормальное содержание эритроцитов с отсутствием статистически значимых отличий от его уровня в крови животных из контрольной группы, принимавших плацебо. Вместе с тем не наблюдалось изменений в числе лейкоцитов и тромбоцитов. Введение соединения DMAE 7–16 в дозах 0,01 г/кг в сутки и 0,04 г/кг в сутки (что соответствует однократной и четырёхкратной дозам) не оказывало значимого влияния на лейкограмму, которая статистически не отличалась от лейкограммы животных с плацебо. В результате обработки данных сделан вывод об отсутствии субхронической токсичности субстанции DMAE 7–16 в отношении крови в исследуемых дозах.

Содержание общего белка у животных экспериментальной группы, которым вводили субстанцию DMAE 7–16 в дозах 0,01 г/кг в сутки и 0,04 г/кг в сутки, было сравнимо с уровнем белка у животных контрольной группы, получавшим 1% крахмальный клейстер. По окончании времени, в течение которого препарат полностью выводится из организма, также измеряли уровень общего белка. Содержание находилось в рамках нормальных значений и статистически не отличалось между всеми группами.

Под влиянием препарата DMAE 7–16 в однократной дозе и четырехкратной дозе содержание глюкозы в крови находилось в пределах физиологической нормы как в первой части эксперимента во время введения препарата, так и после его отмены. Это позволяет сделать заключение о том, что субстанция не оказывает негативного влияния на углеводный обмен.

Концентрация мочевины в крови животных во время применения препарата и после его отмены находилась в диапазонах нормы во всех исследуемых группах, что говорит об отсутствии значимого влияния на фильтрационную функцию почек у субстанции DMAE 7–16.

Во всех исследуемых группах показатели концентрации креатинина соответствовали норме, что говорит об отсутствии негативного влияния исследуемой субстанции DMAE 7–16 в однократной (0,01 г/кг в сутки) и четырехкратной (0,04 г/кг в сутки) дозах на функции почек.

Проведение анализов, выявляющих активность АСТ и АЛТ, показало отсутствие влияния соединения DMAE 7–16 на нормальную функциональность печени.

В течение всех 28 суток, на протяжении которых длился эксперимент, не было зафиксировано ни одной смерти как в экспериментальных группах с введением DMAE 7–16 в однократной и четырехкратной дозах, так и в контрольных группах с введением плацебо. По этой причине все экспериментальные животные были подвержены вскрытию с целью направить на морфологическое исследование следующие внутренние органы: печень, почки, селезенка, гонады, мочевой пузырь, тимус, лёгкие, сердце и головной мозг.

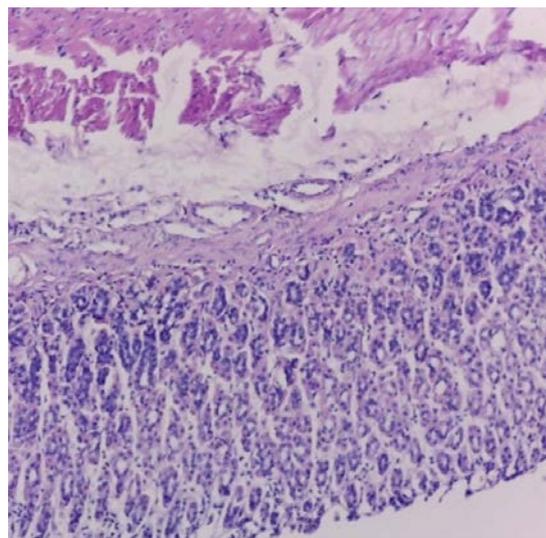
Микроскопическое исследование органов животных всех групп показало, что субстанция DMAE 7–16 в исследуемых дозах не оказывает токсического влияния, приводящего к патологическим изменениям.

Гистологическая картина извлечённых внутренних органов у животных экспериментальной группы, которым вводили соединение DMAE 7–16 в дозах 0,01 г/кг в сутки и 0,04 г/кг в сутки, была аналогична гистологической картине животных из контрольной группы, принимавших 1% крахмальный клейстер.

Общая структура стенки желудка обычная. Толщина железистой слизистой оболочки составляет 410–490 мкм. Желудочные ямки имеют равномерное распределение, ровные контуры, их глубина составляет 80–120 мкм. На поверхности находится среднее количество слизи. Фундальные железы равномерно и плотно распределены в толще

слизистой оболочки желудка, имеют хорошо различимую дифференцировку: поверхностная часть имеет протяжённость 160–190 мкм, образованная слизистыми и париетальными клетками, и нижняя часть длиной примерно 175 мкм, состоящая из главных клеток. Париетальные клетки ацидофильны, содержат гомогенную оксифильную цитоплазму. Главные клетки содержат базофильную цитоплазму со средней степенью гранулированности. Ядерные изменения не обнаружены. Собственная пластинка слизистой оболочки с тонкими прослойками между собственными железами, лейкоцитарной инфильтрации в значительной мере не наблюдается. Остальные оболочки стенки желудка без изменений. Все оболочки имеют равномерное кровенаполнение. Ни у одной из экспериментальных групп не выявлено ulcerогенных признаков.

Подтверждением отсутствия местнораздражающего эффекта у исследуемого соединения служит здоровое состояние желудка и тонкого кишечника без атрофических и иных изменений (рисунок).



Морфологическая картина слизистой оболочки желудка крысы из группы с четырехкратной дозой субстанции DMAE 7–16

Заключение

При изучении субхронической (четырнадцатидневной) токсичности на самцах и самках крыс линии Wistar установлено, что субстанция DMAE 7–16 в однократной (0,01 г/кг в сутки) и четырехкратной (0,04 г/кг в сутки) дозах не оказывает выраженного общетоксического действия на организм лабораторных животных и не обладает местнораздражающим действием.

Результаты биохимического и гематологического исследования крови, показатели гравиметрического исследования, анализ макроскопического и микроскопического исследования внутренних органов крыс, получавших субстанцию DMAE 7–16 в однократной (0,01 г/кг в сут) и четырехкратной (0,04 г/кг в сут) дозах, показали, что данная субстанция не вызывает дистрофических, воспалительных и иных патологических изменений внутренних органов, а также не оказывает местнораздражающего действия в исследуемых дозах.

Исследование выполнено при поддержке программы «УМНИК», договор 15674ГУ/2020.

Список литературы

1. Peresyapkina A.A., Pokrovskiy M.V., Dolzhikov A.A., Levkova E.A., Pobeda A.S., Correction of experimental ischemic neuropathy of the optic nerve by imidazoline receptor agonist type I and II. *Экспериментальная и Клиническая Фармакология*. 2018. Vol. 81. No. 4. P. 12–17. DOI: 10.30906/0869-2092-2018-81-4-12-17.
2. Peresyapkina A.A., Pazhinskiy A.L., Pokrovskiy M.V., Beskhamelnitsyna E.A., Pobeda A.S., Korokin M.V. Correction of Experimental Retinal Ischemia by L-Isomer of Ethylmethylhydroxypyridine Malate. *Antioxidants*. 2019. Vol. 8. No. 2. P. 34. DOI: 10.3390/ANTIOX8020034.
3. Gubareva V.O., Pazhinsky A.L., Lugovskoy S.S., Dubovtsova E.Yu., Vain D.S., Pobeda A.S., Pasenov K.N. Pharmacological correction of morphofunctional retinal injury using 11-amino acid fragment of darbepoetin in the experiment. *Research Results in Pharmacology*. 2019. Vol. 5. No. 3. P. 43–55. DOI: 10.3897/rpharmacology.5.38730.
4. Shabelnikova A.S., Peresyapkina A.A., Pokrovskiy M.V., Lutsenko V.D., Philippenko N.G. Pharmacological preconditioning by recombinant erythropoietin – A new way of treatment of retinal Ischemia/Reperfusion. *International Journal of Pharmacy and Technology*. 2016. Vol. 8. No. 4. P. 26889–26896.
5. Peresyapkina A.A., Gubareva V.O., Levkova E.A., Shabelnikova A.S., Pokrovskiy M.V. Pharmacological correction of retinal ischemia/reperfusion by minoxidil. *Srpski Arhiv Za Celokupno Lekarstvo*. 2018. Vol. 146. No. 9–10. P. 530–533. DOI: 10.2298/SARH170814006P.
6. Lambuk Lidawani, Iezhitsa Igor, Agarwal Renu, Ismail Nafeeza Mohd. Magnesium acetyltaurate prevents retinal damage and visual impairment in rats through suppression of NMDA-induced upregulation of NF-kappa B, p53 and AP-1 (c-Jun/c-Fos). *Neural Regeneration Research* 2021. Vol. 16. No. 11. P. 2330–2344. DOI: 10.4103/1673-5374.310691.
7. Avdeeva N.V., Sidorova S.A., Gudyrev O.S., Osipova O.A., Golubev I.V. Mechanism of neuroprotective effect of mGluR4 agonists. *Research Results in Pharmacology*. 2019. Vol. 5. No. 2. P. 43–47. DOI: 10.3897/rpharmacology.5.36565.
8. Nesterova N.I., Scheblykina O.V., Kolesnichenko P.D., Nesterov A.V., Scheblykin D.V., Yakovlev D. Neuroprotective effects of taurine and 3-hydroxypyridine derivatives in the intracerebral hemorrhage model in rats. *Research Results in Pharmacology*. 2019. Vol. 5. No. 3. P. 87–94. DOI: 10.3897/rpharmacology.5.36988.
9. Пересыпкина А.А., Покровский М.В., Губарева В.О., Левкова Е.А. Коррекция гипертензивной нейрорегинопатии производным диметиламиноэтанола 7-16 в эксперименте // *Кубанский научный медицинский вестник*. 2018. № 25 (1). С. 103–107. DOI: 10.25207/1608-6228-2018-25-1-103-107.
10. Арустамова А.А., Покровский М.В., Шабельникова А.С., Кашуба А.С. Анализ российского оптового рынка глазных капель за 2006 – 1–3 кв. 2012 гг. // *Российский медико-биологический вестник имени академика И.П. Павлова*. 2013. № 21 (4). С. 71–76. DOI: 10.17816/PAVLOVJ2013471-76.
11. Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств. Ч. 1 / Под ред. А.Н. Миронова. М.: Гриф и К, 2013. 944 с.