



ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА ПО НАДЗОРУ В СФЕРЕ ЗАЩИТЫ ПРАВ ПОТРЕБИТЕЛЕЙ
И БЛАГОПОЛУЧИЯ ЧЕЛОВЕКА

Федеральное бюджетное учреждение науки

Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии

«ВЕКТОР»

Институт медицинской биотехнологии

(ИМБТ ФБУН ГНЦ ВБ «ВЕКТОР»)

УТВЕРЖДАЮ

Директор ИМБТ

ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор»

д.б.н., профессор

 В.И. Масычева

«28» февраля 2013 г.


ОТЧЕТ О НАУЧНО-ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКОЙ РАБОТЕ

по договору № 9-НИР-12

«ПРОВЕДЕНИЕ ДОКЛИНИЧЕСКИХ ИСПЫТАНИЙ ПРЕПАРАТА ВИТАЛАНГ-2»

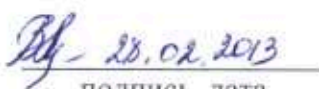





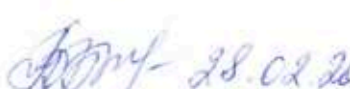

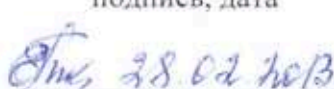
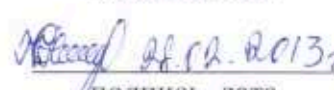

(Заключительный)

Руководитель
и.о. зав. лаборатории иммунологических,
биохимических и фармакокинетических
исследований
отдела биологических исследований
ИМБТ ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор»

 С.Г. Гамалей

Бердск 2013 г.

СПИСОК ИСПОЛНИТЕЛЕЙ

Директор ИМБТ ГНЦ ВБ "Вектор", д-р биол. наук, профессор	 подпись, дата	В.И. Масычева (весь отчет)
Зам. директора ИМБТ ГНЦ ВБ "Вектор", к.б.н.	 подпись, дата	Е.Д. Даниленко (весь отчет)
И.о. зав. лаборатории иммунологических, биохимических и фармакокинетических исследований отдела биологических исследований	 подпись, дата	С.Г. Гамалей (весь отчет)
Старший научный сотрудник отдела биологических исследований	 подпись, дата	Г.М. Сысоева (разделы 1.2,1.3)
Старший научный сотрудник отдела биологических исследований, к.б.н.	 подпись, дата	З.Ф. Урманцева (разделы 1.1,2)
Старший научный сотрудник отдела биологических исследований	 подпись, дата	Т.Д. Дубатолова (разделы 1.1,1.4)
Научный сотрудник отдела биологических исследований	 подпись, дата	А.В. Батенева (раздел 1.1)
Научный сотрудник отдела биологических исследований	 подпись, дата	Г.Г. Шими́на (раздел 1.1)
Инженер отдела биологических исследований	 подпись, дата	Е.И. Попова (разделы 1.2,1.3)
Нач. бюро обеспечения качества и сертификации	 подпись, дата	Н.В. Павлюкова (весь отчет)
Зав. лаб. механизмов регуляции памяти Института физиологии СО РАМН, д-р биол. наук	 подпись, дата	Н.И. Дубровина (раздел 1.1)

РЕФЕРАТ

Отчет 51 стр., 24 табл., 6 рис., 12 источников.

ВЫСОКОПОЛИМЕРНАЯ РНК, ВИТАЛАНГ-2, ЭМБРИОТОКСИЧНОСТЬ, ИММУНОТОКСИЧНОСТЬ, АЛЛЕРГИЗИРУЮЩЕЕ ДЕЙСТВИЕ, МУТАГЕННОСТЬ, МЕСТНО-РАЗДРАЖАЮЩЕЕ ДЕЙСТВИЕ, КРЫСЫ, МЫШИ, МОРСКИЕ СВИНКИ

Целью работ по договору являлось проведение доклинических испытаний препарата Виталанг-2, лиофилизата высокополимерной РНК для приготовления раствора для интраназального применения. В ходе выполнения работы оценивали эмбрио- и фетотоксическое действие препарата, регистрируемое в антенатальном периоде развития; антенатальное повреждающее действие препарата, регистрируемое в постнатальном периоде развития; иммунотоксические, аллергизирующие и мутагенные свойства; местно-раздражающее действие.

Исследование проведено на крысах, морских свинках и белых беспородных мышах в соответствии с «Руководством по экспериментальному (доклиническому) изучению новых фармакологических средств» (М., 2005 г.).

Установлено, что препарат Виталанг-2 в предполагаемой терапевтической дозе 1 мг/кг выраженных эмбриотоксических и тератогенных свойств не проявлял. В дозе, в 10 раз превышающей терапевтическую, препарат оказывал токсическое действие на процесс эмбрионального развития.

Виталанг-2 не проявлял аллергизирующих свойств в дозе 1 мг/кг, в дозе 10 мг/кг индуцировал слабо выраженную аллергическую реакцию немедленного типа.

Установлен слабо выраженный генотоксический эффект препарата Виталанг-2 на генеративные клетки мышей и отсутствие цитогенетической активности на клетках костного мозга.

Ни в одной из исследованных доз препарат не обнаружил признаков иммунотоксического и местно-раздражающего действия.

СОДЕРЖАНИЕ

	Стр.
Введение	7
Основная часть	8
1 Изучение специфической токсичности препарата Виталанг-2	8
1.1 Оценка влияния препарата Виталанг-2 на репродуктивную функцию	8
1.1.1 Материалы и методы	8
1.1.2 Результаты исследования	13
1.2 Оценка иммунотоксических свойств препарата Виталанг-2	32
1.2.1 Материалы и методы	32
1.2.2 Результаты исследования	34
1.3 Оценка алергизирующих свойств препарата Виталанг-2	37
1.3.1 Материалы и методы	37
1.3.2 Результаты исследования	39
1.4 Оценка мутагенных свойств препарата Виталанг-2	42
1.4.1 Материалы и методы	42
1.4.2 Результаты исследования	44
2 Оценка местно-раздражающего действия препарата Виталанг-2	47
2.1 Материалы и методы	47
2.2 Результаты исследования	47
Заключение	49
Список использованной литературы	51

НОРМАТИВНЫЕ ССЫЛКИ

В настоящем отчете о НИР использованы ссылки на следующие стандарты.

1. ГОСТ Р 53434-2009. Принципы надлежащей лабораторной практики.
2. Руководство по экспериментальному (доклиническому) изучению новых фармакологических веществ. М., 2005.
3. Правила лабораторной практики. Приказ Министерства здравоохранения и социального развития Российской Федерации от 23 августа 2010 г. N 708н.

ОПРЕДЕЛЕНИЯ, ОБОЗНАЧЕНИЯ И СОКРАЩЕНИЯ

В настоящем отчете о НИР применяют следующие определения, обозначения и сокращения:

АОК – антителообразующие клетки

ГА – гемагглютинины

ЭБ – эритроциты барана

ГЗТ – гиперчувствительность замедленного типа

ИР - индекс реакции

ККР – краниокаудальный размер

НСТ – нитросиний тетразолиевый

ОЭБ – опсонизированные эритроциты барана

ЯСК – ядродержащие клетки

УРПИ – условная реакции пассивного избегания

ВВЕДЕНИЕ

Препарат Виталанг-2 представляет собой комплекс односпиральных высокополимерных РНК, выделенных из дрожжей *Saccharomyces cerevisiae*, с олеиновой кислотой. Ранее было показано, что Виталанг-2 обладает выраженными иммуотропными свойствами и может быть использован для повышения неспецифической резистентности человека и животных при профилактике и лечении инфекционных заболеваний [1].

Целью работы по договору являлось доклиническое исследование специфической токсичности препарата Виталанг-2, включающее изучение влияния препарата на репродуктивную функцию, исследование иммуотоксических свойств, аллергизирующего действия, мутагенных свойств препарата Виталанг-2, а также его местно-раздражающего действия на лабораторных животных.

Исследования проводились в соответствии с Протоколом доклинического испытания специфической токсичности и местно-раздражающего действия препарата Виталанг-2, лиофилизата высокополимерной РНК для приготовления раствора для интраназального введения ПИ-04/2012, который был составлен в соответствии с «Руководством по экспериментальному (доклиническому) изучению новых фармакологических средств» [2] и включал следующий набор тестов:

- при изучении репродуктивной токсичности препарата- оценка эмбрио- и фетотоксического действия, регистрируемого в антенатальном периоде развития, а также изучение антенатального повреждающего действия препарата, регистрируемого в постнатальном периоде развития, на крысах линии Wistar;

- при изучении иммуотоксичности- определение массы и клеточности органов иммунной системы мышей, фагоцитарной активности перитонеальных макрофагов, оценка интенсивности гуморального иммунного ответа и влияния препарата на показатели клеточного иммунного ответа к гетерологичному антигену;

- при изучении аллергизирующих свойств- оценка анафилактогенной активности в реакции общей анафилаксии и кожно-сенсibiliзирующего действия в конъюнктивальном тесте на морских свинках, реакции гиперчувствительности «замедленного» типа на мышах;

- при изучении мутагенных свойств препарата - учет аберраций хромосом в клетках костного мозга и доминантных летальных мутаций в зародышевых клетках мышей;

- при изучении местно-раздражающего действия - макроскопическое и гистологическое исследование места введения препарата, тканей носоглотки мышей.

ОСНОВНАЯ ЧАСТЬ

1 ИЗУЧЕНИЕ СПЕЦИФИЧЕСКОЙ ТОКСИЧНОСТИ ПРЕПАРАТА ВИТАЛАНГ-2

1.1 Оценка влияния препарата Виталанг-2 на репродуктивную функцию

1.1.1 Материалы и методы

Животные. Исследования проводили на 140 крысах линии Wistar, самцах и самках, с массой тела 230-270 г, полученных из питомника Филиала «Столбовая» ФГБУ НЦБМТ РАМН (Московская обл., Чеховский район). До эксперимента и в ходе исследования животные содержались в стандартных условиях вивария при естественном освещении на сбалансированном пищевом рационе.

Препарат. В экспериментах использовали препарат Виталанг-2, лиофилизат для интраназального применения (серия 160611, ООО «Виталанг», г. Новосибирск).

Метод изучения эмбрио- и фетотоксического действия препарата, регистрируемого в антенатальном периоде развития

Перед началом эксперимента у самок крыс определяли стадию эстрального цикла. Самок, находящихся в стадии эструса, подсаживали на сутки к самцам в соотношении 2:1. Оплодотворение регистрировали микроскопированием влагалищных мазков. Первым днем беременности считали день, когда в вагинальном мазке были обнаружены сперматозоиды.

Для исследования отобрали 54 беременные самки крыс, которые были разделены на три экспериментальные группы, 2 опытные и 1 контрольную, по 18 голов в каждой.

Дозы препарата Виталанг-2 для крыс первой и второй опытных групп составляли 1 мг/кг (предполагаемая терапевтическая доза) и 10 мг/кг (доза, десятикратно превышающая терапевтическую), соответственно. Препарат растворяли в воде для инъекций и вводили беременным самкам крыс ежедневно с 1 по 19 день беременности интраназально в объеме 0,080 мл на 240 г массы тела, по 0,040 мл в каждый носовой ход. Контрольным беременным животным в течение того же периода времени вводили интраназально эквивалентный объем воды для инъекций.

Ежедневно с 1-го по 19-й день беременности регистрировали массу тела беременных крыс экспериментальных групп, оценивали внешний вид и поведение животных.

Токсическое действие препарата на развитие эмбрионов исследовали на 20-й день беременности после эвтаназии экспериментальных животных. В ходе патоморфологического исследования регистрировали следующие показатели:

- количество желтых тел беременности;
- количество мест имплантации;

- количество живых плодов;
- количество погибших эмбрионов;
- масса эмбрионов;
- масса плаценты;
- кранио-каудальный размер плодов (ККР);
- внешние аномалии, уродства;
- число и локализация гематом.

На основании полученных данных рассчитывали предимплантационную и постимплантационную смертность плодов, суммарную массу плаценты и плодов у каждой беременной самки, количество подкожных кровоизлияний (в процентах). Предимплантационную и постимплантационную смертность рассчитывали по формулам [2,3]:

$$\text{ПРС} = (\text{ЖТ} - \text{МИ}) / \text{ЖТ} * 100\%,$$

$$\text{ПОС} = (\text{МИ} - \text{ЖЭ}) / \text{МИ} * 100\%,$$

где ПРС – предимплантационная смертность,

ПОС – постимплантационная смертность,

МИ – количество мест имплантации,

ЖТ – количество желтых тел в яичниках

ЖЭ – количество живых эмбрионов.

Для оценки состояния костной системы половину плодов фиксировали в 96%-ном этиловом спирте и окрашивали ализарином по методике Доусона. Вторую половину плодов фиксировали в жидкости Буэна для последующего исследования состояния внутренних органов. Аномалии развития изучали по методике Вильсона [2].

Статистическую обработку экспериментальных данных проводили с помощью пакета программ “ Statgraphics, Vers.5.0” (Statistical Graphics Corp., USA). Достоверность отличий оценивали с помощью непараметрического критерия Манна – Уитни – Вилкоксона.

Метод изучения антенатального повреждающего действия препарата, регистрируемого в постнатальном периоде развития

Исследование проводили на 20 беременных самках крыс. Животных распределяли между 2 группами, опытной и контрольной, по 10 голов в каждой. Препарат Виталанг-2 вводили беременным самкам крыс опытной группы в дозе 10 мг/кг (десятикратная терапевтическая доза) ежедневно с 6 дня беременности до родов интраназально в объеме 0,080 мл на животное, по 0,040 мл в каждый носовой ход. Контрольным беременным

крысам вводили интраназально по той же схеме эквивалентный объем воды для инъекций.

Тестирование, в соответствии с [2], проводили у самок с первого дня беременности, у потомства - начиная со второго дня жизни. На каждое животное заполняли индивидуальную карту наблюдений. У самок регистрировали общее состояние, массу тела, дату родов, число крысят, самцов и самок, родившихся и оставшихся в живых к концу вскармливания (21 сут.); вычисляли размер помета и индекс гибели потомства. Из помета каждой самки оставляли 6 - 8 новорожденных (по 4 самца и самки). У потомства определяли массу тела на 4, 7, 14, 21 -й день жизни.

Физическое развитие потомства оценивали по следующим признакам:

- на 2-й день - отлипание ушной раковины;
- на 5-й день - появление первичного волосяного покрова;
- на 14-й день - открытие глаз.

Оценку динамики формирования сенсорно-двигательных рефлексов у крысят проводили по следующим показателям: переворачивание на плоскости, отрицательный геотаксис, маятниковый рефлекс, мышечная сила. Двигательную активность потомков оценивали на 30-й день жизни на приборе "ANIMEX" (LKB, Швеция), регистрируя количество общих и резких движений за 3 минуты.

Исследовательско-ориентировочные реакции крысят 30-дневного возраста изучали в тесте "открытого поля", регистрируя такие показатели, как количество пересеченных квадратов, число стоек, дефекаций, груминг.

В возрасте одного месяца потомков крыс отсаживали от матерей, отделяли самцов от самок и содержали каждый помет отдельно до двухмесячного возраста.

Оценку обучаемости и памяти потомков крыс, матерям которых в период беременности вводили препарат Виталаг-2, проводили по способности к обучению пассивным и активным условным реакциям избегания.

Для оценки обучаемости и памяти потомков формировали экспериментальные группы двухмесячных крысят, самцов и самок контрольной и опытной групп, методом случайной выборки, отбирая по 2 животных обоего пола из каждого помета:

- Группа 1- контрольная группа, самцы -10 особей
- Группа 2- опытная группа, самцы-10 особей
- Группа 1а-контрольная группа, самки -9 особей
- Группа 2а- опытная группа, самки-10 особей.

Оценку обучаемости и памяти потомков проводили в тестах пассивного избегания с отрицательным подкреплением и активного избегания с отрицательным подкреплением.

Выработка условной реакции пассивного избегания (УРПИ) в одном сочетании проводилась по общепринятой методике. Экспериментальная камера трапецевидной формы состояла из двух отделений. Светлый отсек освещался лампой 60 ватт, находящейся на уровне 50 см от верхнего края установки, темный – закрывался сверху светонепроницаемой крышкой. Пол камеры выполнен из двух металлических пластин, на которые в темном отделении подавался электрический ток. В перегородке между отсеками на уровне пола размещалось отверстие, закрываемое дверью. Каждую крысу помещали в светлый отсек хвостом к отверстию. В день выработки рефлекса, когда крыса разворачивалась и входила в темный отсек четырьмя лапами, она получала электрокожное раздражение от стабилизированного по току сетевого источника интенсивностью 0,5 мА и длительностью 2 секунды. Дверь оставалась открытой, и животное выбегало в светлый отсек. Крыса извлекалась из светлой половины камеры и переносилась в домашнюю клетку. Для проверки обучения УРПИ крыса через 24 часа после выработки помещалась в светлое отделение камеры хвостом к отверстию. Основным показателем выработки условного рефлекса служил латентный период перехода в темное отделение. Критерием хорошей выработки считался латентный период перехода, превышавший 80 секунд.

Выработка условной реакции активного избегания проводилась в автоматической челночной камере (shuttle box) с программным обеспечением (ИФТ-04). Условным стимулом служил свет, безусловным – ток. После трех минут ознакомления с установкой в отсеке, где находилась крыса, включалась электрическая лампочка (10 W), вмонтированная в стенку камеры над дверью. Через 5 секунд изолированного действия условного стимула на металлическую решетку пола подавался электрический ток (0,7 мА), который отключался вместе со светом при переходе крысы в другой отсек. Временной интервал между сочетаниями условного стимула с безусловным наказанием составлял от 22 до 30 секунд, предъявляемый в случайном порядке для предотвращения выработки реакции на время. Крыс обучали в одной сессии, состоящей из 50 проб (сочетания условного и безусловного стимулов). В межстимульный период животные могли переходить из одного отсека камеры в другой. В ходе опыта регистрировались следующие показатели формирования следа памяти:

1. Число сочетаний до первого правильного условного ответа (реакция избегания).
2. Число реакций избавления, когда крыса переходила в другой отсек после нанесения болевого раздражения.
3. Число реакций избегания, когда особь переходила на безопасную половину установки после включения света до получения раздражения током.
4. Число переходов в межстимульный период.

5. Число невыполненных (нулевых) реакций при сочетании условного стимула с безусловным подкреплением – крыса оставалась в отсеке при воздействии света и тока. Для оценки динамики выработки условной реакции активного избегания показатели 2 – 5 разбивали на 5 блоков и усредняли по 10 проб.

Результаты исследований обработаны статистически с помощью дисперсионного однофакторного и двухфакторного ANOVA для повторных наблюдений с последующим post hoc анализом по Ньюмену–Кейслу и использованием теста множественных попарных сравнений LSD.

Методы оценки пренатального введения препарата Виталанг-2 на физиологические, гематологические, биохимические и патоморфологические показатели потомков.

Через 60 суток после рождения из крысят каждого помета случайным образом формировали экспериментальные группы, отдельно из самцов и самок, по 6 особей каждого пола в опытной и контрольной группах (всего 24 животных). Крысят взвешивали, определяли температуру тела, после чего подвергали эвтаназии с помощью углекислого газа, забирали кровь на гематологический и биохимический анализ, проводили вскрытие, патоморфологическое исследование, взвешивание внутренних органов с вычислением их весовых индексов (масса органа в мг, деленная на массу животного в г, умноженная на 10).

В образцах крови с помощью автоматического гематологического анализатора «Hemolux 19» (КНР) определяли число лейкоцитов, эритроцитов и тромбоцитов, уровень гемоглобина, гематокрит. Определение СОЭ и расчет лейкограммы проводили стандартными методами [4].

Биохимический анализ крови включал измерение содержания в сыворотке крови общего белка, мочевины, глюкозы, общего холестерина, а также активности ряда сывороточных ферментов (аланин- и аспаргатаминотрансфераз, щелочной фосфатазы). Уровень биохимических показателей крови определяли с помощью наборов реагентов «Протеин-Ново», «Новохол», «Новокарб», «Новоглюк», «Трансаминаза – АСТ – Ново», «Трансаминаза – АЛТ – Ново», «Новофосфал» (ЗАО «Вектор-Бест», п. Кольцово Новосибирской обл.).

Статистическую обработку экспериментальных данных проводили с помощью пакета программ “Statgraphics, Vers.5.0” (Statistical Graphics Corp., USA). Для оценки значимости межгрупповых различий использовали t-критерий Стьюдента в случае нормального распределения признака и U-критерий Манна-Уитни в случае, когда

распределение признака было отлично от нормального. Критический уровень значимости при проверке статистических гипотез (p) принимали равным 0,05.

1.1.2 Результаты исследования

Данные изучения эмбрио- и фетотоксического действия препарата Витланг-2, регистрируемого в антенатальном периоде развития

Исследование показало, что беременность в группах крыс, которым препарат Виталанг-2 вводили в течение 19 дней после покрытия в дозах 1 мг/кг и 10 мг/кг, сохранялась, соответственно, в 67 % и 89 % случаев. В контрольной группе данный показатель составил 61 %. В большинстве случаев, когда беременность не развивалась, у животных отмечали признаки эндометрита.

Введение препарата Виталанг-2 самкам крыс в течение 19 дней беременности не приводило к снижению массы тела животных или скорости ее нарастания. Показатель прироста массы тела в опытных группах крыс составил $112,8 \pm 6,2$ г (Виталанг-2, 1 мг/кг) и $94,9 \pm 9,6$ г (Виталанг-2, 10 мг/кг), в контрольной - $88,0 \pm 12,0$ г (различия статистически недостоверны, $p > 0,05$).

Данные, представленные в таблице 1, свидетельствуют о том, что препарат Виталанг-2 не оказывал существенного влияния на показатели прегимплантационной и постимплантационной смертности.

Введение препарата с 1 по 19 день беременности не приводило к значимым изменениям массы плаценты, среднего количества плодов на самку, их массы и кранио-каудального размера (табл.1). При макроскопическом осмотре плодов крыс в контрольной группе животных не было обнаружено аномалий развития. В то же время в группах «Виталанг-2, 1 мг/кг» и «Виталанг-2, 10 мг/кг» было зарегистрировано появление эмбрионов с кровоизлияниями, вплоть до множественных гематом в разных участках тела (6,3 % и 5,5 %, соответственно). Кроме того, были обнаружены такие единичные аномалии, как окрашенный позвоночник (возможно, вследствие гематомы), бледные кожные покровы, обозначенная сетка сосудов на голове, нарушение пропорций тела (большая голова). Общее количество указанных нарушений составило 6,6 % и 7,1 %, соответственно, для первой и второй опытных групп.

Частота встречаемости гематом в различных органах и тканях плодов, обнаруженная при вскрытии самок крыс, которым вводили Виталанг-2 в дозе 1 мг/кг и 10 мг/кг, составляла 33,8 и 47,5 %, соответственно, при контрольном уровне показателя 11,4 % (табл. 2). В частности, были обнаружены кровоизлияния в печени и легких, что

Таблица 1 - Показатели эмбриотоксического действия препарата Виталанг-2 при интраназальном введении крысам в дозах 1 и 10 мг/кг с 1 по 19 день беременности

Показатели	Препарат, доза		
	Вода для инъекций	Виталанг-2, 1 мг/кг	Виталанг-2, 10 мг/кг
Количество беременных самок	13	12	16
Количество желтых тел: -общее количество -в пересчете на одну самку ²	146 11,2±0,7	155 12,9± 0,6	190 11,9±0,4
Количество мест имплантации: -общее количество -в пересчете на одну самку ²	116 8,9±1,1	134 11,2±0,7	138 8,6±0,7
Количество живых плодов: -общее количество -в пересчете на одну самку ²	111 8,5±1,1	122 10,2±0,8	130 8,1±0,7
Количество мертвых плодов: -общее количество -в пересчете на одну самку ²	5 0,4±0,1	12 1,0±0,3	8 0,5±0,2
Предимплантационная гибель ² , %	24,5±7,3	13,8±3,7	28,1±4,7
Постимплантационная гибель ² , %	4,3±2,0	10,2±4,0	6,1±2,2
Масса плода ^{1,2} , г	2,4±0,1	2,5±0,1	2,6±0,1
Краниокаудальный ^{1,2} размер, мм	31,5±0,5	31,8±0,4	31,9±0,6
Масса плаценты ^{1,2} , г	0,58±0,30	0,57±0,01	0,58±0,02
Внешний осмотр плодов: -количество обследованных плодов; -из них с аномалиями развития, абс, %	87 0 0	122 8 6,6	127 9 7,1
Состояние костной системы: -количество обследованных плодов -из них с аномалиями развития, абс, %	41 9 22,0	50 12 24,0	47 20 42,6
Плоды с подкожными гематомами, %	0	6,3	5,5

Примечание. ¹- указаны средние значения в пересчете на одну самку; ²- данные представлены как среднее значение ± ошибка среднего (M±m).

Таблица 2 - Нарушения развития, отмеченные при исследовании плодов крыс, полученных от самок, которым вводили Виталанг-2

Вид нарушения	Количество плодов, имевших данное нарушение, в группах					
	Вода для инъекций		Виталанг-2, 1 мг/кг		Виталанг-2, 10 мг/кг	
	абс.	% к общему количеству	абс.	% к общему количеству	абс.	% к общему количеству
Кровоизлияния в различные органы и ткани	4	11,4	23	33,8	29	47,5
Застойные явления в печени	0	0	0	0	0	0
Холестаз	1	2,8	8	11,8	9	14,8
Гидронефроз	4	11,4	6	8,8	15	24,6
Умеренное расширение желудочков головного мозга	11	31,4	14	20,6	23	37,7
Нефроптоз	10	28,6	9	13,2	15	24,6
Гемоперикард	0	0	0	0	0	0
Всего обследовано плодов	35	-	68	-	61	-

может свидетельствовать о влиянии препарата на проницаемость сосудов.

При микроанатомическом исследовании плодов крыс в группе, получавшей препарат Виталанг-2 в дозе 10 мг/кг, зарегистрированы различные умеренно выраженные anomalies головного мозга и почек, аналогичные наблюдаемым у контрольных животных (табл. 2). В группе животных, получавших терапевтическую дозу препарата Виталанг-2, те же виды нарушений в головном мозге и почках встречались в 1,5 - 2 раза реже, чем в контроле и второй опытной группе. В опытных группах животных значительно увеличивалось количество плодов с явлениями холестаза (11,8 и 14,8 % после введения препарата в дозах 1 и 10 мг/кг, соответственно, при контрольном уровне показателя 2,8 %).

Морфологическое исследование плодов крыс, которым вводили Виталанг-2 в дозе 1 мг/кг, не выявило достоверных отличий параметров развития скелета плодов от показателей контроля. Введение препарата в дозе 10 мг/кг приводило к появлению у плодов anomalies черепа и грудины (табл. 3).

Таблица 3 - Показатели развития костного скелета эмбрионов крыс на 20-е сутки пренатального периода

Отделы скелета	Показатели развития скелета, среднее значение / % аномалий (недоразвитие)		
	Вода для инъекций	Виталанг-2, 1 мг/кг	Виталанг-2, 10 мг/кг
Плюсна	3,02 / 0	3,12 / 0	3,10 / 2,1
Пястье	2,79 / 7,3	2,86 / 6,0	2,9 / 2,0
Грудина	2,45 / 26,8	2,31 / 24,0	2,29 / 34,0
Крестец	3,76 / 7,3	4,08 / 10,0	3,6 / 10,6
Ребра	13 / 0	13 / 0	13,0 / 2,0
Череп	1 / 4,8	1 / 6	1 / 27,7

Регистрируемые нарушения заключались, в основном, в ослаблении процесса оксификации костей. Отсутствие центров оксификации (менее 2 точек окостенения) в грудины плодов крыс после введения Виталанга-2 в дозе 10 мг/кг было зарегистрировано в 34,0 % случаев (в контроле 26,8 %). В 4,3% случаях у плодов опытной группы обнаружены центры чрезмерной оксификации грудины (6 костей при варианте нормы от 2 до 4 костей) при полном отсутствии таких нарушений в контрольной группе. У плодов крыс опытной группы в 27,7 % случаев наблюдали недоразвитие костей черепа (в контрольной группе такие случаи составили 4,58 %), имел место случай полного отсутствия костей черепа у одного эмбриона. У этого плода наблюдали также отсутствие ребра и неравномерное окостенение ребер («прерывистые ребра»). Обращает на себя внимание ассиметричный характер изменения скелета в случаях, когда не наблюдалось уменьшения точек окостенения. Например, встречаются случаи ассиметричности кости черепа при нормальном ее развитии, случаи несимметричного окрящевания ребер только с одной стороны, разное количество точек окостенения в крестце (в контрольной группе таких явлений не обнаружено).

На основании полученных данных можно заключить, что введение препарата Виталанг-2 в терапевтической дозе самкам крыс с 1 по 19 день беременности не приводило к повышению показателей пре- и постимплантационной смертности, не оказывало существенного влияния на процесс формирования костной системы плодов, однако повышало число кровоизлияний во внутренние органы и ткани эмбрионов, что может быть связано с повышением под действием препарата проницаемости сосудов. В

дозе, десятикратно превышающей терапевтическую, Виталанг-2 оказывал токсическое действие на процесс эмбрионального развития, которое проявлялось в увеличении количества плодов с гематомами, аномалиями развития внутренних органов и скелета.

Данные изучения антенатального повреждающего действия препарата Виталанг-2, регистрируемого в постнатальном периоде развития

Введение препарата Виталанг-2 не оказывало существенного влияния на внешний вид беременных крыс и нарастание массы тела животных, которое составило к 21-му дню беременности $119,1 \pm 5,2$ г в опытной группе крыс, $103,8 \pm 6,6$ г - в контроле. Длительность беременности равнялась $22,2 \pm 0,2$ и $22,4 \pm 0,2$ суткам, соответственно.

Введение препарата в период беременности не вызывало уменьшения числа родившихся крысят. Более того, наблюдалось повышение общего и среднего количества крысят в расчете на самку (на 59 и 37%, соответственно) (табл.4). Препарат не приводил к изменению соотношения полов в помете при рождении и через 21 сутки после рождения, по сравнению с показателями контрольной группы. Индекс гибели крысят опытной группы в течение периода вскармливания не отличался от показателя контрольной группы. При этом наблюдались половые различия в показателях постнатальной гибели животных: гибель самцов опытной группы в течение периода вскармливания была в 2 раза выше, чем в контрольной группе, в то время как показатель гибели самок был ниже контрольного показателя в 2,6 раза.

Введение препарата не оказывало влияния на показатели физического развития крысят (сроки отлипания ушных раковин, появление волосяного покрова, открытие глаз, табл. 5). Изучение формирования безусловных рефлексов у потомства показало, что созревание таких рефлексов, как переворачивание на плоскости, отрицательный геотаксис, мышечная сила, маятниковый рефлекс в регистрируемые сроки происходило одинаково как в контрольной, так и в опытной группах животных (табл. 5, 6).

Динамика нарастания массы тела крысят опытной группы обоего пола в течение 21 суток после рождения не отличалась от соответствующей динамики контрольных животных (табл. 7).

Препарат Виталанг-2 не приводил к изменению спонтанной двигательной активности крысят, протестированных по окончании периода вскармливания (30 сутки, табл.8).

Таблица 4 - Показатели смертности потомков крыс, подвергнутых интраназальному воздействию препарата Виталанг-2 с 6 дня беременности до родов

Препарат, доза	Количество родивших крыс	Количество крысят при рождении						Количество крысят на 21 сутки после рождения						Индекс гибели животных, %		
		всего	самцы	самки	самцы	самки	%	всего	самцы	самки	самцы	самки	%	всего	самцы	самки
Вода для инъекций	8	61/8 ¹	22	39	36,1	63,9	43/5 ¹	17	26	39,5	60,5	29,5	22,7	33,3		
Виталанг-2, 10 мг/кг	9	97/11 ¹	50	47	51,5	48,9	68/8 ¹	27	41	39,7	60,3	29,9	46	12,8		

¹ - в числителе общее количество, в знаменателе – на самку.

Таблица 5 – Параметры физического развития и созревания сенсорно-двигательных рефлексов потомства крыс, получавших интраназально препарат Виталанг-2 с 6 дня беременности до родов

Исследуемые признаки	Появление признаков в группах, дни после рождения					
	Вода для инъекций			Виталанг-2, 10 мг/кг		
	всего	самцы	самки	всего	самцы	самки
<i>Параметры физического развития:</i>						
Отлипание ушных раковин	2	2	2	2	2	2
Появление волосяного покрова	5	5	5	5	5	5
Открытие глаз	16 (14-17)	16 (14-17)	16 (14-17)	15 (14-17)	16 (14-17)	15 (14-17)
<i>Рефлексы:</i>						
-переворачивание на плоскости	8	8	8	8	8	8
-отрицательный геотаксис	7 (7-8)	7 (7-8)	8 (7-8)	7 (7-9)	7 (7-9)	7 (7-8)
-мышечная сила	20 (15-24)	19 (15-24)	21 (16-24)	19 (15-24)	19 (15-24)	20 (15-24)

Таблица 6 - Показатели маятникового рефлекса у потомков крыс, матерям которых интраназально вводили препарат Виталанг-2 с 6 дня беременности до родов

Препарат, доза	Потомки крыс	Маятниковый рефлекс			
		7 сутки		8 сутки	
		повороты, число/жив.	реверсии, число/жив.	повороты, число/жив.	реверсии, число/жив.
Вода для инъекций	всего	2,1±0,2	0,3±0,1	4,0±0,3	1,0±0,2
	самцы	2,1±0,4	0,1±0,1	4,2±0,5	0,8±0,2
	самки	1,9±0,3	0,4±0,1	3,8±0,4	1,1±0,2
Виталанг-2, 10 мг/кг	всего	2,3±0,2	0,4±0,1	3,9±0,3	0,7±0,1
	самцы	2,5±0,3	0,5±0,2	4,3±0,4	0,8±0,2
	самки	2,2±0,3	0,4±0,1	3,7±0,4	0,6±0,1

Таблица 7 - Масса тела потомков крыс, получавших препарат Виталанг-2 с 6 дня беременности и до родов

Препарат, доза	Кол. поме тов	Масса тела крысят, г											
		4 сут			7 сут			14 сут			21 сут		
		самцы	самки	оба пола	самцы	самки	оба пола	самцы	самки	оба пола	самцы	самки	оба пола
Вода для инъекций	8	9,7±0,2	9,6±0,2	9,7±0,2	14,5±0,6	14,8±0,4	14,7±0,3	26,0±0,9	26,4±0,7	26,2±0,5	44,2±1,5	45,7±1,0	45,1±0,9
Виталанг-2, 10 мг/кг	9	10,0±0,3	9,6±0,1	9,8±0,1	15,5±0,4	14,3±0,4	14,8±0,3	26,8±0,7	25,0±0,7	25,7±0,5	44,7±1,3	43,3±1,1	43,8±0,8

Таблица 8 – Спонтанная двигательная активность потомков крыс, получавших препарат Виталанг-2 с 6 дня беременности и до родов (30 суток после рождения)

Препарат, доза	Кол. поме тов	Количество движений за 3 минуты					
		резкие			общие		
		самцы	самки	оба пола	самцы	самки	оба пола
Вода для инъекций	8	210,6±8,1	205,4±8,4	207,5±5,9	348,2±10,0	344,6±10,6	346,0±7,4
Виталанг-2, 10 г/кг	9	215,8±6,7	198,4±5,7	205,3±4,4	359,4±7,3	342,1±6,7	349,0±5,0

Изучение поведения крысят в этот же период в тесте «открытого поля» показало, что пренатальное введение Виталанга-2 не отражалось на горизонтальной двигательной активности животных, эмоциональных реакциях (груминг, дефекации), но снижало показатели вертикальной активности (число стоек) у потомков-самцов (на 33%, табл. 9).

Таблица 9 - Показатели ориентировочно-исследовательских реакций крыс, матерям которых в период беременности вводили препарат Виталанг-2 (30 суток после рождения)

Препарат	Потомки крыс	Показатели тестирования			
		квадраты	стойки	груминг	дефекации
Вода для инъекций	всего	21,6±1,4	3,6±0,4	0,4±0,1	0,5±0,2
	самцы	21,2±2,0	3,6±0,8	0,3±0,2	1,1±0,4
	самки	21,8 ±1,9	3,6±0,5	0,4±0,1	0,2±0,1
Виталанг-2, 10 мг/кг	всего	19,2±1,0	2,4±0,3 *	0,1±0,1	0,6±0,2
	самцы	16,3±1,3	1,6±0,3 *	0,1±0,1	1,2±0,3
	самки	21,2±1,4	2,9±0,4	0,2±0,1	0,3±0,1

* - статистически значимое отличие от контроля (вода для инъекций), $p < 0,05$.

Таким образом, введение препарата Виталанг-2 самкам крыс в дозе, десятикратно превышающей терапевтическую, с 6 дня беременности до родов приводило к повышению ранней постнатальной смертности потомков-самцов. Препарат не оказывал существенного влияния на показатели физического развития и сроки формирования безусловных рефлексов потомства обоего пола в течение периода вскармливания.

Данные, полученные при изучении способности к обучению пассивным и активным условным реакциям избегания потомков крыс, матерям которых в период беременности вводили препарат Виталаг-2.

В первой серии исследования было установлено, что все животные обучались условной реакции пассивного избегания независимо от статуса матери (рис.1).

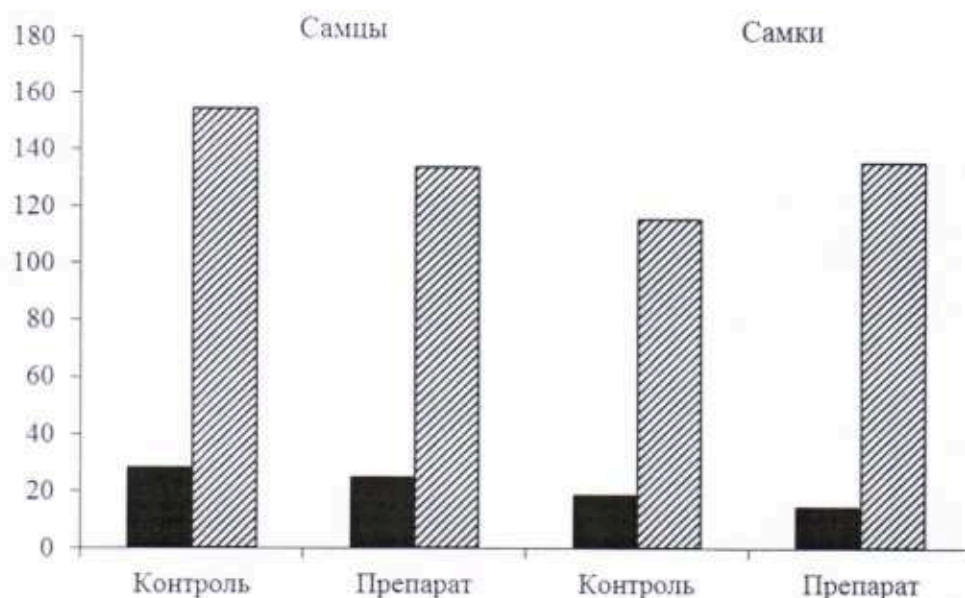


Рис.1. Условная реакция пассивного избегания. По вертикали – латентный период перехода, сек, по горизонтали – группы крыс. Темные столбики – латентный период перехода в день обучения, заштрихованные – латентный период перехода при тестировании через 1 сутки после выработки рефлекса.

Это видно по статистически значимому возрастанию латентного периода перехода при тестировании через 1 сутки после процедуры выработки рефлекса по сравнению с днем обучения ($p < 0,0001$), что свидетельствует о формировании у всех особей условной реакции страха.

Во второй серии опытов анализ обучения условной реакции активного избегания показал следующие результаты.

На рисунке 2 видно, что по числу сочетаний условного стимула (свет) с безусловным болевым наказанием до появления 1-ой условной реакции (переход на безопасную половину установки после включения света до получения раздражения током) потомки от самок с воздействием препарата Виталанг-2 не отличались от контрольных особей.

Статистическая оценка с помощью однофакторного анализа не показала достоверных результатов при любом сочетании групп ($p > 0,05$).

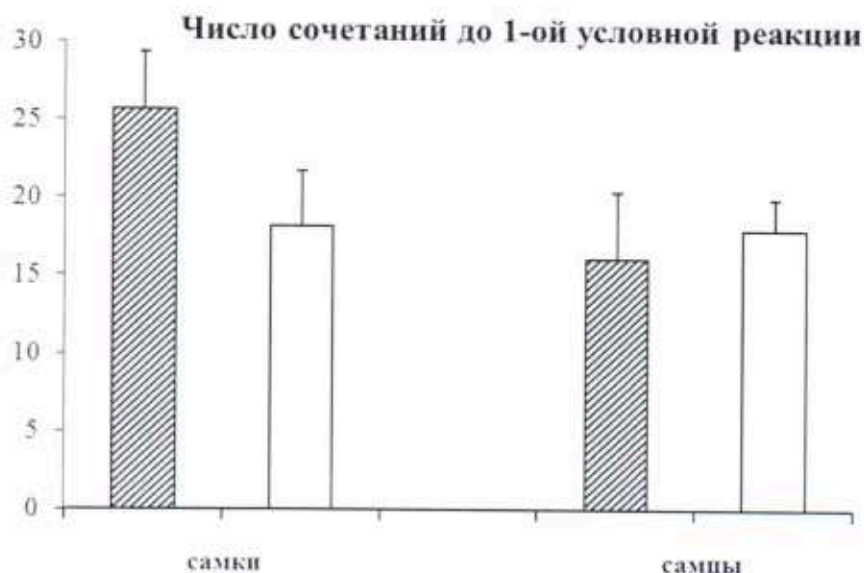


Рис.2. Условная реакция активного избегания.

Заштрихованные столбцы – контроль. Светлые столбцы – данные от потомков матерей, подвергавшихся действию препарата Виталанг-2.

При анализе динамики числа реакций избегания, представленной на рис.3, ANOVA всех групп показал достоверность факторов группы ($F_{3,35} = 4.49, p=0,009$), блока ($F_{4,140} = 5.13, p=0,001$) и взаимодействие факторов ($F_{12,140} = 2.29, p=0,011$). При дальнейшем анализе этого показателя статистическая значимость факторов обнаружена лишь для опытных групп 2 + 2а: для фактора группы $F_{1,18} = 5.73, p=0,03$, для блока $F_{4,72} = 8.76, p=0,00$, для взаимодействия $F_{4,72} = 3.33, p=0,01$, но не для контрольных групп 1 + 1а. Плановыми сравнениями выявлено, что в начале обучения активному избеганию (сочетания 1 – 30-е) контрольные самки характеризовались более высокими значениями числа избеганий ($p < 0,05$), то есть переходили на безопасную половину установки после получения болевого раздражения. Такое отличие самок от самцов характерно и для потомков от крыс с воздействием препарата Виталанг-2. Что касается различий между контрольными и опытными животными, то значимые различия были обнаружены лишь у самок (группы 1а и 2а) в конце процедуры обучения, блок 5 – $F_{1,35} = 5.68, p=0,02$.

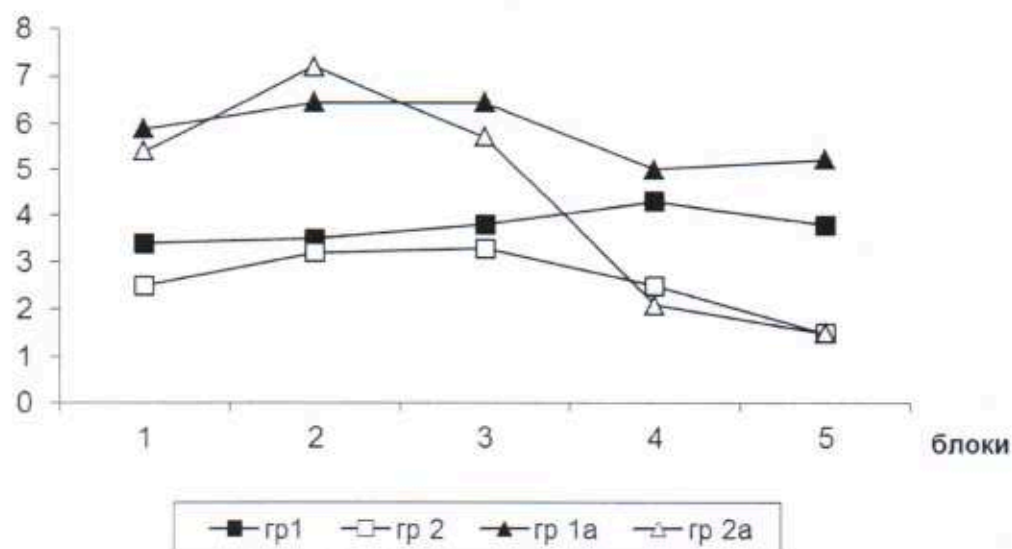


Рис.3. Динамика показателя числа реакций избавления при формировании условной реакции активного избегания. По вертикали – количество избавлений, по горизонтали – номер блока.

Оценка обучаемости по основному параметру появления условных реакций активного избегания обнаружила значимость фактора блока ($F_{4,140} = 11.51, p=0,000$), но не фактора группы и не взаимодействия факторов. Из рисунка 4 следует, что у крыс всех групп к 40-му сочетанию условного стимула и болевого наказания этот показатель стал выше, что свидетельствует о выработке рефлекса. Особенно четко это проявилось у самок, как в контроле, так и в опытной группе.

Общий анализ числа переходов в межстимульный период у крыс всех групп показал достоверность фактора блока – $F_{4,140} = 3.72, p=0,007$, но не группы – $F_{4,35} = 1.15, p=0,342$ (рис. 5). Данный показатель скорее отражает двигательную и исследовательскую активность, сопряженную с процессом формирования следа памяти.

Достаточно интересные данные получены при анализе числа невыполненных (нулевых) реакций (рис. 6). Снижение значений в ходе процедуры выработки рефлекса свидетельствует о формировании ассоциации между условным стимулом и безусловным болевым раздражением. Общий анализ этого показателя по данным всех 4-х групп показал значимость фактора группы ($F_{3,35} = 7.88, p=0,000$), блока ($F_{4,140} = 16.78, p=0,000$), но не взаимодействия факторов ($F_{12,140} = 0.50, p=0,91$). Следует отметить, что введение Виталанг-2 матерям не повлияло на данный показатель у потомков, так как не было значимых различий между группами 1 и 2, также между 1a и 2a в течение всей

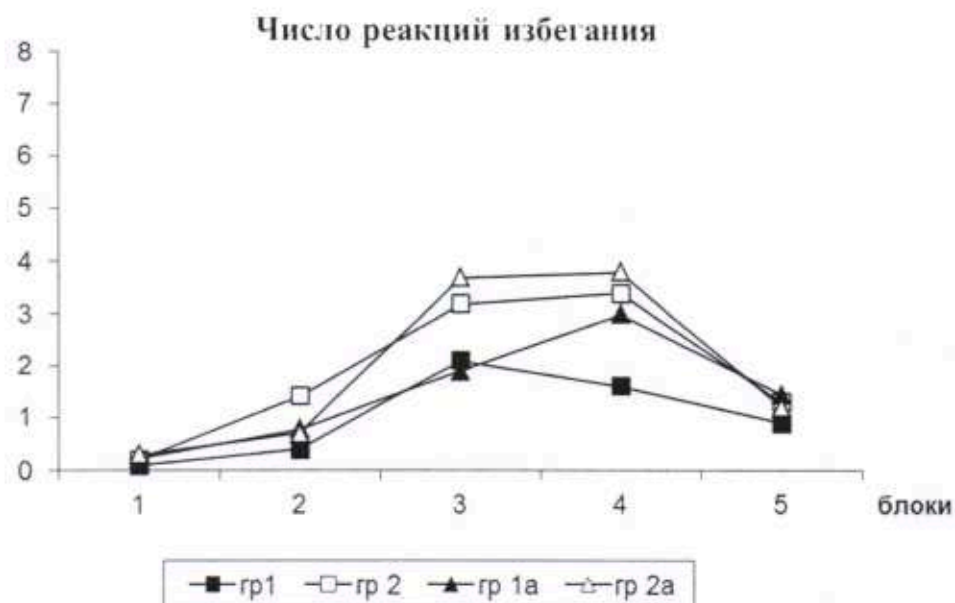


Рис.4. Динамика показателя числа реакций избегания при формировании условной реакции активного избегания.

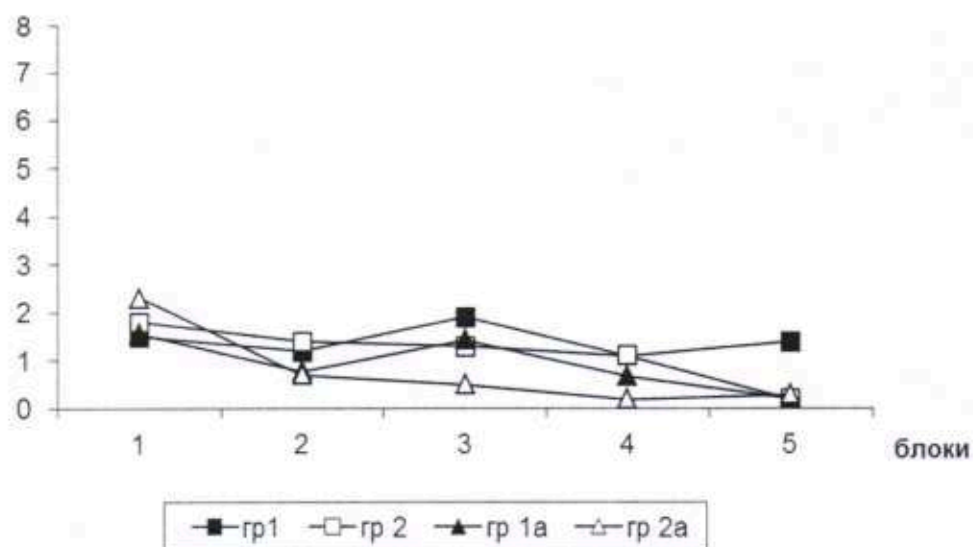


Рис. 5. Динамика показателя числа переходов между сочетаниями при формировании условной реакции активного избегания.

процедуры обучения условной реакции активного избегания ($p < 0,05$). При этом оказались существенны различия между самками и самцами, как в контроле, так и в опыте.

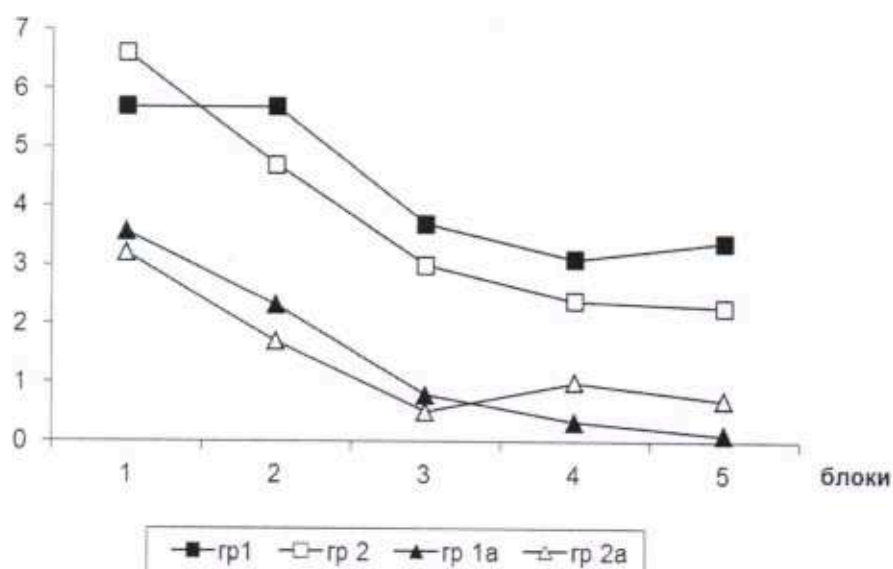


Рис.6. Динамика показателя числа нулевых реакций при формировании условной реакции активного избегания.

Таким образом, введение препарата Виталанг-2 матерям в период беременности не оказывало существенного влияния на процессы формирования, сохранения и воспроизведения условной реакции пассивного избегания и условной реакции активного избегания их двухмесячных потомков.

Для того, чтобы оценить, вызывает ли пренатальное введение препарата Виталанг-2 длительные изменения функции интегральных физиологических систем, уровня основных видов обмена, структуры и функции внутренних органов потомков крыс, был проведен анализ этих показателей у половозрелого потомства в возрасте 60 дней.

Данные физиологического исследования 60-дневных крысят. Многократное интраназальное введение препарата Виталанг-2 самкам крыс в дозе, десятикратно превышающей терапевтическую, не приводило к изменению внешнего вида 60-дневных крысят, их поведения, не отражалось на потреблении ими пищи и воды. Температура тела опытных животных не отличалась от контрольных показателей (табл. 10). Не обнаружено статистически значимых различий в показателях массы тела самок-потомков крыс опытной и контрольной групп (табл.10). В опытной группе самцов отмечено незначительное по величине, но статистически значимое повышение массы тела животных, по сравнению с контролем (на 8,3%, $p \leq 0,05$).

Таблица 10 – Физиологические показатели двухмесячных потомков самок крыс, получавших с 6 дня беременности до родов препарат Виталанг-2

Препарат	Масса	Температура
	Самцы	
Вода для инъекций	324,5±9,2	38,04±0,1
Виталанг-2, 10 мг/кг	354,0±10,3 *	38,14±0,1
Самки		
Вода для инъекций	245,0±4,2	38,24±0,1
Виталанг-2, 10 мг/кг	244,0±4,8	37,96±0,2

* - статистически значимое отличие от контроля (вода для инъекций), $p < 0,05$.

Данные гематологического исследования 60-дневных крысят. Гематологический анализ показал, что многократное введение Виталанга-2 приводило к изменениям ряда показателей периферической крови. В крови потомков крыс опытной группы регистрировали умеренное по величине повышение числа тромбоцитов крови (на 18,7 % у самцов и 15,2 % у самок крыс, табл.11), что может свидетельствовать о повышенной свертываемости крови животных. В крови 60-дневных самцов отмечено снижение относительного числа лимфоцитов (на 30%) и повышение - числа сегментоядерных нейтрофилов (на 74%), возможно, перераспределительного характера.

Данные биохимического исследования 60-дневных крысят. Следствием многократного введения препарата Виталанг-2 беременным самкам крыс явилось умеренное повышение в крови крысят - самок содержания глюкозы (на 14%), снижение содержания мочевины (на 23,7 %) и активности аланинаминотрансферазы (на 25,2 %) (табл.12). Увеличение уровня глюкозы при сниженном уровне мочевины крови может свидетельствовать об активации углеводного обмена при сниженном уровне катаболизма белков [4]. У крысят-самцов обнаружено незначительное по величине повышение уровня аспартатаминотрансферазы на 13,1%.

Данные патоморфологического исследования 60-дневных крысят. В ходе визуального обследования 60-дневных крысят, матерям которых с 6 дня беременности до родов вводили препарат Виталанг-2 в дозе 10 мг/кг, не обнаружено изменений внешнего вида животных экспериментальных групп.

Таблица 11 – Гематологические показатели крови двухмесячных потомков самок крыс, получавших с 6 дня беременности до родов препарат Виталанг-2

Препарат, доза	Гемогло- бин, г/л	Эритроци- ты, $10^{12}/л$	Гемато- крит, %	Тромбоци- ты, $10^9 /л$	СОЭ, мм/ч	Лейкоци- ты, $10^9 /л$	Лейкоцитарная формула, %				
							эозино- филы	нейтрофилы		моноциты	лимфоциты
								палочкояд.	сегментояд.		
Самцы											
Вода для инъекций	174,8±6,2	8,7±0,3	45,4±1,6	645,7±14,8	2,2±0,8	5,4±1,0	2,3±0,7	1,0±0,4	26,2±3,6	5,8±0,7	64,7±4,0
Виталанг-2	163,2±2,8	8,2±0,2	42,3±0,7	766,5±40,7 *	1,8±0,2	7,1±0,5	2,2±0,3	0,8±0,5	45,8±2,6 *	5,5±0,6	45,7±2,5 *
Самки											
Вода для инъекций	163,7±4,2	7,7±0,2	42,1±1,1	640,5±24,6	1,5±0,3	7,9±0,8	3,0±0,6	1,0±0,3	37,7±4,7	5,2±0,7	53,2±5,2
Виталанг-2	149,2±4,4	7,1±0,3	38,6±1,1	738,0±38,1 *	1,3±0,2	7,0±0,6	2,2±0,5	1,7±0,6	40,0±5,7	4,2±1,0	52,0±5,9

* - статистически значимое отличие от контроля (вода для инъекций), $p < 0,05$.

Таблица 12 – Биохимические показатели крови двухмесячных потомков самок крыс, получавших с 6 дня беременности до родов препарат Виталанг-2 (60 суток после рождения)

Препарат, доза	Общий белок, г/л	Глюкоза, ммоль/л	Холестерин, ммоль/л	Мочевина, ммоль/л	Аланин аминотрансфераза, Е/л	Аспаргат аминотрансфераза, Е/л	Щелочная фосфатаза, Е/л
Самцы							
Вода для инъекций	60,0 ± 2,1	6,41 ± 0,33	2,27 ± 0,18	10,7 ± 0,3	22,8 ± 2,3	53,3 ± 2,0	884 ± 58
Виталанг-2, 10 мг/кг	60,4 ± 1,7	6,77 ± 0,10	2,17 ± 0,15	11,5 ± 0,4	27,7 ± 1,5	60,3 ± 2,0 *	853 ± 53
Самки							
Вода для инъекций	65,4 ± 1,1	7,30 ± 0,23	2,44 ± 0,22	14,0 ± 0,9	32,1 ± 2,4	58,7 ± 2,2	621 ± 53
Виталанг-2, 10 мг/кг	63,1 ± 0,7	8,32 ± 0,35 *	2,01 ± 0,07	10,7 ± 0,5 *	24,0 ± 2,1 *	56,0 ± 2,2	786 ± 84

* - статистически значимое отличие от контроля (вода для инъекций), p<0,05.

Интраназальное введение препарата самкам крыс не приводило к изменению веса внутренних органов 60-дневных потомков (табл. 13). Макроскопическая картина внутренних органов подопытных крыс не отличалась от наблюдаемой в контрольной группе.

То есть, многократное интраназальное введение препарата Виталанг-2 беременным самкам крыс в дозе, десятикратно превышающей терапевтическую, не вызывало значительных изменений физиологических гематологических и биохимических показателей, макроскопической картины и веса внутренних органов половозрелых потомков.

Результаты, полученные в ходе изучения антенатального повреждающего действия препарата Виталанг-2, позволяют заключить, что введение препарата самкам крыс в дозе, десятикратно превышающей терапевтическую, с 6 дня беременности до ее окончания приводило к повышению ранней постнатальной смертности потомков-самцов. Препарат не оказывал существенного влияния на показатели физического развития, сроки формирования безусловных рефлексов потомства в течение периода вскармливания. Не обнаружено изменений в показателях условно-рефлекторной деятельности, функции интегральных физиологических систем, состоянии внутренних органов взрослых потомков. В крови потомков отмечен ряд незначительных по величине изменений гематологических и биохимических показателей крови, которые могут свидетельствовать о повышении свертываемости крови и активации углеводного метаболизма.

Суммируя результаты двух этапов исследований, можно заключить, что препарат Виталанг-2 в предполагаемой терапевтической дозе выраженных эмбриотоксических и тератогенных свойств не обнаруживал. В дозе, в 10 раз превышающей терапевтическую, препарат оказывал токсическое действие на процесс эмбрионального развития, которое проявлялось в увеличении количества плодов с аномалиями развития внутренних органов и скелета, повышении ранней постнатальной смертности самцов.

Таблица 13 –Относительная масса внутренних органов потомков самок крыс, получавших с 6 дня беременности до родов препарат Виталанг-2 (60 суток после рождения)

Препарат, доза	Масса животного-го, г	Весовые индексы органов, мг/г*10							
		сердце	легкое	печень	почки		селезенка	тимус	надпочечники
					левая	правая			
Самцы									
Вода для инъекций	306,2±6,0	33,3±0,9	47,0±2,5	306,5±9,5	30,2±1,6	29,7±1,5	39,8±4,0	14,2±1,6	1,7±0,2
Виталанг-2, 10 мг/кг	335,0±2,9 *	32,8±2,1	43,8±1,2	294,8±5,1	31,0±1,5	31,5±1,2	36,7±2,3	10,2±1,5	1,8±0,2
Самки									
Вода для инъекций	237,8±2,5	35,0±1,4	59,8±2,6	352,8±12,4	31,5±1,4	32,2±1,0	63,3±3,4	19,8±2,6	3,1±0,1
Виталанг-2, 10 мг/кг	232,5±2,7	34,0±1,0	60,3±3,5	320,5±6,9	31,0±0,7	32,2±0,5	51,5±3,6	17,3±1,6	3,2±0,2

* - статистически значимое отличие от контроля (вода для инъекций), p<0,05.

1.2 Оценка иммунотоксических свойств препарата Виталанг-2

1.2.1 Материалы и методы

Препарат. В экспериментах использовали препарат Виталанг-2, лиофилизат высокополимерной РНК для приготовления раствора для интраназального применения (серия 160611, 30 мг/флакон, ООО «Виталанг», г. Новосибирск).

Животные. Исследования проводили на 144 мышах линии BALB/c, самках массой 18-22 г, полученных из питомника ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор». До начала и в ходе эксперимента животные содержались в стандартных условиях вивария при естественном освещении, на сбалансированном пищевом рационе.

Методы оценки иммунотоксического действия. Препарат Виталанг-2 вводили интраназально в дозах 1 или 10 мг/кг в объеме 0,025 мл (по 0,0125 мл в каждый носовой ход, однократно (в соответствии с предполагаемыми дозами, способом и кратностью введения тестируемого препарата в клинике). Контрольным животным в те же сроки вводили воду для инъекций в эквивалентном объеме. Каждая экспериментальная группа состояла из 7 особей. Оценка состояния иммунной системы проводили, используя в качестве параметров массу лимфоидных органов, число антителообразующих клеток селезенки, титры гемагглютининов, показатели метаболической активности перитонеальных макрофагов, реакцию гиперчувствительности замедленного типа (ГЗТ) к чужеродному антигену. Определение показателей проводили через сутки и 20 суток после введения препарата.

Метод определения массы и клеточности органов иммунной системы

Мышей выводили из эксперимента методом мгновенной дислокации шейных позвонков, извлекали лимфоидные органы: тимус, селезенку, подчелюстные лимфоузлы. Лимфоидные органы взвешивали на весах Sartorius Basic Plus BP 110S и рассчитывали их весовые индексы по формуле: вес органа/вес тела * 10 (мг/10 г). Для определения клеточности селезенку от каждой мыши взвешивали и помещали во флаконы со средой 199 для предотвращения высыхания органа. Для получения клеточной суспензии в лунки 6-ти луночного планшета, содержащие 3 мл среды 199, помещали ситечки для растирания органа, переносили селезенку из флакона в лунку и плоской стороной ручки поршня шприца объемом 2-5 мл продавливали ее через ситечко. Суспензию клеток готовили в разведении 1:30. Затем клетки ресуспендировали с помощью пипетки, готовили разведение клеток в 3% растворе уксусной кислоты для подсчета концентрации ядросодержащих клеток (ЯСК) в камере Горяева. Результаты выражали в абсолютных единицах числа ЯСК в органе и в относительных значениях по отношению к массе органа. Аналогичным способом проводили определение клеточности тимуса.

Метод определения фагоцитарной активности перитонеальных макрофагов

Определение функциональной активности перитонеальных макрофагов проводили в краткосрочной монослойной культуре клеток перитонеального экссудата с помощью НСТ-теста [5].

Взвесь перитонеальных макрофагов в полной среде RPMI, содержащей 10% фетальной сыворотки, глутамин и гентамицин, вносили в лунки 96-луночного плоскодонного планшета и культивировали при 37⁰ С в течение 2 часов. После инкубации удаляли неприкрепившиеся клетки, дважды промывая лунки раствором Хенкса. Затем в каждую лунку добавляли 50 мкл полной среды RPMI, 100 мкл раствора нитросинего тетразолиевого (НСТ) с концентрацией 1 мкг/мл и 50 мкл 1%-ной суспензии опсонизированных эритроцитов барана (ОЭБ). После инкубации в течение часа клетки отмывали раствором Хенкса, фиксировали 10%-ным раствором формалина и добавляли в каждую лунку 60 мкл 2 М КОН и 70 мкл диметилсульфоксида. Уровень функциональной активности клеток оценивали по изменению оптической плотности раствора, измеренной при длине волны 620 нм на приборе Multiskan. Результаты выражали в условных единицах, отражающих оптическую плотность содержимого лунок.

Метод оценки влияния препарата Виталанг-2 на интенсивность гуморального иммунного ответа

Оценку влияния препарата на гуморальный иммунный ответ проводили с помощью метода локального гемолиза и реакции гемагглютинации. Основными показателями служили количество антителообразующих клеток (АОК) и титры антител (гемагглютининов, ГА) в сыворотке иммунизированных животных [6, 7].

Иммунизацию мышей проводили корпускулярным Т-зависимым антигеном, эритроцитами барана (ЭБ), через 24 часа после введения препарата Виталанг-2 или воды для инъекций. Суспензию трижды отмытых в стерильном физиологическом растворе эритроцитов барана вводили внутрибрюшинно в дозе, равной $2 \cdot 10^8$ ЭБ/мышь. Количество АОК и титры антител в сыворотке у иммунизированных животных определяли через 5 суток после иммунизации.

Метод оценки влияния препарата Виталанг-2 на показатели клеточного иммунного ответа к гетерологичному антигену

Оценку влияния препарата на клеточный иммунный ответ проводили с использованием в качестве модели реакции гиперчувствительности замедленного типа (ГЗТ) к корпускулярному антигену, эритроцитам барана (ЭБ) [6]. Реакцию ГЗТ индуцировали внутрибрюшинным введением суспензии эритроцитов барана (10^7 ЭБ) через сутки после введения препарата. Для оценки величины реакции мышам на пятые

сутки после иммунизации в подушечку одной из лап вводили разрешающую дозу антигена (10^8 ЭБ), в контрольную лапу - физиологический раствор. Через 24 часа после инъекции определяли массу опытной и контрольной лап и по разнице их масс, выраженной в процентах, рассчитывали индекс реакции (ИР).

Статистическую обработку данных проводили с помощью пакета статистических программ "Statgraphics, Vers.5.0" (Statistical Graphics Corp., USA). Достоверность обнаруженных межгрупповых различий оценивали с использованием t-критерия Стьюдента.

1.2.2 Результаты исследования

Данные о влиянии препарата Виталанг-2 на массу и клеточность органов иммунной системы

Однократное интраназальное введение препарата Виталанг-2 в предполагаемой терапевтической дозе (1 мг/кг) и в дозе, превышающей терапевтическую в 10 раз, не оказывало влияния на массу иммунокомпетентных органов мышей (табл. 14).

Таблица 14 - Относительная масса иммунокомпетентных органов мышей линии BALB/c через сутки после однократного интраназального введения препарата Виталанг-2

Препарат, доза	Масса животного, г	Весовые индексы органов мг/10 г			
		селезенка	тимус	лимфоузлы	
				левый	правый
Вода для инъекций	19,6±0,3	85,7±3,4	29,0±2,5	4,0±0,4	3,6±0,5
Виталанг-2, 1 мг/кг	19,8±0,2	86,3±6,1	26,4±0,9	4,1±0,3	4,0±0,3
Виталанг-2, 10 мг/кг	19,3±0,3	99,0±5,5	28,2±1,0	4,5±0,3	4,1±0,4

Введение препарата не приводило к изменению клеточности тимуса и селезенки мышей опытных групп по сравнению с контрольными показателями (табл. 15).

Таблица 15 - Количество ядросодержащих клеток лимфоидных органов мышей линии Balb/c через сутки после однократного интраназального введения препарата Виталанг-2

Препарат, доза	Тимус		Селезенка	
	Масса, мг	Число ЯСК, 10^6 /орган	Масса, мг	Число ЯСК, 10^6 /орган
Вода для инъекций	46,4±3,4	117,7±9,7	85,7±3,4	321,1±20,8
Виталанг-2, 1 мг/кг	42,5±3,2	110,0±14,6	86,27±6,1	330,1±29,0
Виталанг-2, 10 мг/кг	47,0±1,6	115,6±8,1	99,0±5,5	379,7±28,8

Данные о влиянии препарата Виталанг-2 на функциональную активность перитонеальных макрофагов

Терапевтическая доза препарата Виталанг-2 не вызывала изменения показателей окислительно-восстановительной активности фагоцитов, как спонтанной, так и индуцированной фагоцитозом опсонизированных эритроцитов барана (табл. 16).

Введение препарата в дозе 10 мг/кг приводило к снижению функциональной активности перитонеальных макрофагов через 1 сутки после введения (на 20 %, табл. 16), по сравнению с контролем. Через 20 суток после введения этот показатель не отличался от показателя контроля. На основании этих данных можно заключить, что препарат Виталанг-2 не вызывает необратимых изменений функциональной активности клеток-фагоцитов.

Таблица 16 - Влияние препарата Виталанг-2 на метаболическую активность макрофагов при однократном введении мышам линии Balb/c

Препарат, доза	Количество макрофагов, 10^6 кл/мл	Уровень восстановленного НСТ, о.е.	
		спонтанный	ОЭБ
Через 1 сутки после введения			
Вода для инъекций	3,79±0,43	0,16±0,01	0,20±0,01
Виталанг-2, 1 мг/кг	4,51±0,55	0,14±0,01	0,19±0,01
Виталанг-2, 10 мг/кг	4,87±1,23	0,14±0,01	0,16±0,01*
Через 20 суток после введения			
Вода для инъекций	4,36±0,49	0,13±0,01	0,17±0,01
Виталанг-2, 1 мг/кг	4,36±0,43	0,14±0,01	0,20±0,02
Виталанг-2, 10 мг/кг	4,46±0,23	0,13±0,003	0,17±0,01

* - различия достоверны по отношению к контролю (вода для инъекций), $p \leq 0,05$.

Данные о влиянии препарата Виталанг-2 на гуморальный иммунный ответ мышей

Введение препарата в дозе 1 мг/кг приводило к выраженной стимуляции гуморального иммунного ответа, что выражалось в достоверном увеличении относительного и абсолютного количества АОК (на 58 и 75%, соответственно) относительно контрольного уровня (табл. 17). Результаты подсчета количества ядросодержащих клеток в селезенке свидетельствуют о том, что полученный иммуностимулирующий эффект реализуется не за счет увеличения числа ЯСК, а в результате повышения в селезенке количества активных антителопродуцентов.

Таблица 17 – Показатели гуморального иммунного ответа мышей линии Balb/c, иммунизированных ЭБ через сутки после интраназального введения препарата Виталанг-2

Препарат, доза	Количество ЯСК/селезенку ($\times 10^6$)	Количество АОК на млн. ЯСК селезенки	Количество АОК на селезенку	Титры ГА
Вода для инъекций	305,7 \pm 7,4	75,5 \pm 9,7	20545 \pm 4503	7,43 \pm 0,20
Виталанг-2, 1мг/кг	315,1 \pm 26,1	119,7 \pm 19,4 *	36031 \pm 5208 *	7,81 \pm 0,09
Виталанг-2, 10 мг/кг	426,8 \pm 30,23 *	72,5 \pm 10,9	24373 \pm 2925	7,43 \pm 0,18

* - различия достоверны по отношению к показателям контроля, $p \leq 0,05$.

Препарат Виталанг-2 в 10-кратной терапевтической дозе не вызывал статистически значимых изменений числа АОК и титров гемагглютининов, но повышал количество ЯСК селезенки, что может свидетельствовать о поликлональной стимуляции препаратом лимфоцитов селезенки.

Данные о влиянии препарата Виталанг-2 на клеточный иммунный ответ мышей

Оценка влияния препарата Виталанг-2 на реакцию ГЗТ к эритроцитам барана показала, что инъекции препарата в дозах 1 и 10 мг/кг не оказывали влияния на величину реакции мышей через сутки после введения (табл. 18). Полученные результаты свидетельствуют о том, что препарат Виталанг-2 не влияет на клеточный иммунный ответ мышей.

Таблица 18 - Влияние препарата Виталанг-2 на реакцию гиперчувствительности замедленного типа к эритроцитам барана через сутки после введения мышам линии BALB/c

Препарат, доза	Индекс реакции ГЗТ, ИР
Контроль	26,93±2,48
Виталанг-2, 1 мг/кг	23,76±3,08
Виталанг-2, 10 мг/кг	30,10±2,15

Таким образом, препарат Виталанг-2 при однократном интраназальном введении в терапевтической дозе не оказывал влияния на массу и клеточность иммунокомпетентных органов, функциональную активность перитонеальных макрофагов, показатели клеточного иммунного ответа и усиливал гуморальный иммунный ответ мышей. В дозе, в 10 раз превышающей терапевтическую, препарат вызывал повышение числа ядросодержащих клеток селезенки без активации процесса антителообразования и обратимое снижение метаболической активности макрофагов. На основании полученных данных можно заключить, что препарат Виталанг-2 не вызывает изменений, которые свидетельствовали бы о выраженном либо длительно сохраняющемся угнетении функции клеток иммунной системы. Следовательно, препарат не проявляет иммунотоксических свойств.

1.3 Оценка алергизирующих свойств препарата Виталанг-2

1.3.1 Материалы и методы

Препарат. В экспериментах использовали препарат Виталанг-2, лиофилизат высокополимерной РНК для приготовления раствора для интраназального применения (серия 160611, 30 мг/флакон, ООО «Виталанг», г. Новосибирск).

Животные. Исследования проводили на 56 морских свинках (самцах и самках) массой 250-290 г и 40 белых беспородных мышах ICR (самцах) с массой тела 24-26 г, полученных из питомника ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор». Животные содержались группами при естественном освещении и свободном доступе к воде и пище.

Метод оценки анафилактических свойств препарата Виталанг-2

Исследования проводили на 32 морских свинках-самцах и самках массой 250-290 г.

Сенсибилизацию морских свинок осуществляли препаратом Виталанг-2 в дозе 1 мг/кг (группа 1) и 10 мг/кг (группа 2), трехкратно: первый раз - подкожно, второй и третий - внутримышечно. Анафилактические свойства выявляли путем внутрисердечного введения препарата на 21-е сутки после первой сенсибилизирующей инъекции.

Тестирующая доза составляла: для группы 1- 3 мг/кг (суммарная сенсibilизирующая доза), для группы 2 - 10 мг/кг (доза, максимально возможная для введения). Контролем служили несенсибилизированные морские свинки, которым препарат вводили внутрисердечно, в дозах 3 и 10 мг/кг (группы 3 и 4, соответственно).

Учет интенсивности анафилактической реакции проводили по методу Weigle [8] с наблюдением за состоянием животных в течение двух часов с момента введения разрешающей дозы препарата. Подсчет индекса реакции осуществляли по следующей формуле:

$$AI = \frac{n \times 4 + n_1 \times 3 + n_2 \times 2 + n_3 \times 1}{N},$$

где

AI - анафилактический индекс;

n - число животных, анафилактическая реакция которых заканчивалась смертельным исходом (++++),

n₁ - число животных со значительными проявлениями анафилактической реакции (+++),

n₂ - число животных с реакцией средней степени выраженности (++),

n₃ - число животных со слабой реакцией (+),

N - общее число животных в группе.

При величине AI не более 1,0 анафилактическая реакция считалась отрицательной.

Метод изучения влияния препарата Виталанг-2 на слизистую оболочку глаз морских свинок (конъюнктивальный тест)

Исследования проводили на 24 морских свинках - самцах и самках массой 250-290 г. Морские свинки были распределены между 3 группами. Сенсibilизацию животных осуществляли путем однократного интраназального введения препарата Виталанг-2 в дозе 1 мг/кг в объеме 40 мкл (группа 1). Позитивный контроль представляли свинки, которым инъецировали подкожно раствор овальбумина (5 мг/кг) в полном адьюванте Фрейнда (ПАФ) в соотношении 1:1 (группа 2), отрицательный контроль - животные, которые получили физиологический раствор (группа 3). Через сутки сенсibilизированным животным под верхнее веко правого глаза вводили каплю водного раствора препарата Виталанг-2 в дозе 1 мг/кг (группа 1) или 1%-ого раствора овальбумина (группа 2), а под верхнее веко левого глаза - каплю воды.

Несенсибилизированным морским свинкам, получившим физиологический раствор (группа 3), под правое верхнее веко вводили каплю физиологического раствора, а под левое веко – каплю воды. Оценка состояния конъюнктивы глаз проводилась через 15 мин и 4 часа после воздействия. Реакцию учитывали по следующей шкале в баллах:

- 1 - легкое покраснение слезного протока;
- 2 - покраснение слезного протока и склеры в направлении к роговице;
- 3 - покраснение всей конъюнктивы и склеры.

Метод оценки сенсibiliзирующих свойств препарата Виталанг-2 на мышцах

Для оценки сенсibiliзирующих свойств препарата Виталанг-2 на белых беспородных мышцах ICR использовали реакцию гиперчувствительности замедленного типа [6]. Мышей сенсibiliзировали однократно путем внутрикожного введения в основание хвоста 60 мкл эмульсии препарата в ПАФ в соотношении 1:1. Препарат вводили в дозах 1 мг/кг и 10 мг/кг. Контрольным животным вводили ПАФ в том же объеме.

Тестирование проводилось на 5-е сутки после введения сенсibiliзирующей дозы препарата. Тестирующие дозы препарата (1 и 10 мг/кг) вводили сенсibiliзированным и несенсибилизированным мышам в подушечку одной из лап в объеме 50 мкл физиологического раствора. В другую лапу вводился физиологический раствор в том же объеме. Через 24 часа определяли массу опытной и контрольной лап. Индекс реакции (ИР) вычисляли по формуле:

$$\text{ИР} = (M_{\text{оп}} - M_{\text{к}}) / M_{\text{к}}$$

где $M_{\text{к}}$ – масса контрольной лапы;

$M_{\text{оп}}$ – масса опытной лапы.

1.3.2 Результаты исследования.

Результаты исследования анафилактикогенных свойств препарата Виталанг-2 на морских свинках.

Результаты исследования анафилактикогенной активности препарата в экспериментах на морских свинках представлены в таблице 19. Ни в одной из опытных групп гибели животных при тестировании не наблюдалось.

При испытании препарата в дозе 1 мг/кг (предполагаемая терапевтическая) не было обнаружено выраженных признаков аллергии (характерного почесывания мордочки, чихания или судорог). У 6 из 8 животных, которым вводили препарат Виталанг-2, наблюдались признаки слабой аллергической реакции в виде почесываний.

Анафилактический индекс реакции составлял 0,75, что в соответствии с методикой, считается отрицательной реакцией на разрешающее воздействие исследуемого препарата.

Таблица 19 - Индекс общей анафилактической реакции у морских свинок, сенсibilизированных трехкратно препаратом Виталанг-2 (21 сутки после первой сенсibilизирующей инъекции)

Группа	Количество животных в группе	Количество животных, давших анафилактическую реакцию					АИ
		++++	+++	++	+	-	
Контроль	8	0	0	0	0	8	0
Виталанг-2, 1 мг/кг	8	0	0	0	6	2	0,75
Контроль	8	0	0	0	0	8	0
Виталанг-2, 10 мг/кг	8	0	1	2	4	1	1,4

Трехкратная сенсibilизация морских свинок препаратом Виталанг в дозе 10 мг/кг, вызывала появление слабо выраженной реакции у 4 из 8 животных, реакции средней степени выраженности- у 2 из 8, у 1 морской свинки наблюдались значительные проявления анафилактической реакции. АИ реакции у животных, сенсibilизированных препаратом в дозе 10 мг/кг, равен 1,4, что свидетельствует о наличии алергизирующего потенциала у препарата Виталанг-2 в дозах, превышающих терапевтическую.

Таким образом, препарат Виталанг-2 при интраназальном введении морским свинкам в терапевтической дозе не вызывал развития анафилактической реакции. Применение препарата в десятикратной терапевтической дозе приводило к появлению признаков анафилаксии. Эти данные свидетельствуют о возможности возникновения алергической реакции немедленного типа при использовании препарата в дозах, превышающих терапевтическую.

Результаты оценки алергической активности на морских свинках в конъюнктивальном тесте

Сенсibilизация морских свинок препаратом Виталанг-2 в терапевтической дозе 1 мг/кг не вызывала изменений слезного протока, склеры, конъюнктивы при последующем тестировании (табл.20). Через 15 минут и 4 часа после закапывания раствора препарата в глаз сенсibilизированных морских свинок не наблюдалось гиперемии, инфильтрации слезного протока, слизистой конъюнктивы и склеры.

В случае применения препарата сравнения овальбумина закапывание препарата в глаз сенсibilизированных животных приводило к значительному покраснению слезного протока и склеры в направлении к роговице (у 2 из 8 морских свинок), покраснению всей конъюнктивы и склеры (у 6 из 8 морских свинок), которые исчезали на 2 сутки наблюдения.

Таблица 20 - Показатели конъюнктивальной реакции у морских свинок, сенсibilизированных однократно интраназально препаратом Виталанг-2 (1 сутки после сенсibilизации)

Группа	Количество животных в группе	Количество животных, давших конъюнктивальную реакцию, баллы				Среднее значение/группу
		3	2	1	0	
Контроль, несенсibilизированные животные	8	0	0	0	8	0
Положительный контроль, овальбумин	8	6	2	0	0	2,75
Виталанг-2, 1 мг/кг	8	0	0	0	8	0

Таким образом, методом конъюнктивальной пробы установлено, что препарат Виталанг-2 в терапевтической дозе не обладал специфическими сенсibilизирующими свойствами, то есть не оказывал алергизирующего действия на слизистую глаза.

Результаты исследования реакции гиперчувствительности замедленного типа на белых беспородных мышях, сенсibilизированных препаратом Виталанг-2

Данные, представленные в таблице 21, свидетельствуют о том, что подкожное сенсibilизирующее введение мышам препарата в ПАФ не вызывало развития реакции ГЗТ. Величина индекса реакции на тестирующее введение препарата Виталанг-2 в опытных группах мышей достоверно не отличалась от показателей контрольных несенсibilизированных животных.

Таблица 21 - Индекс реакции ГЗТ у мышей ICR, sensibilizированных препаратом Виталанг-2

Группа	Количество животных в группе	Индекс реакции ГЗТ через 24 часа после sensibilizации
Контроль, несensibilizированные животные	10	3,05±0,57
Виталанг-2, 1 мг/кг	10	3,41±0,73
Контроль, несensibilizированные животные	10	3,21±0,77
Виталанг-2, 10 мг/кг	10	5,03±1,03

Таким образом, оценка алергизирующего действия препарата Виталанг-2 на мышцах и морских свинок показала, что препарат в терапевтической дозе (1 мг/кг) не проявлял алергизирующих свойств. Данные, полученные при изучении свойств препарата в дозе, в 10 раз превышающей терапевтическую, свидетельствуют о возможности индукции алергической реакции немедленного типа.

1.4 Оценка мутагенных свойств препарата Виталанг-2

1.4.1 Материалы и методы

Материалы. В экспериментах использовали препарат Виталанг-2, лиофилизат высокополимерной РНК для приготовления раствора для интраназального применения (серия 160611, 30 мг/флакон (ООО «Виталанг», г. Новосибирск). В качестве препарата сравнения использовали препарат циклофосфан (Лэнс-Фарма ООО, Верофарм ЗАО, Россия), негативным контролем служил физиологический раствор.

Исследование *генотоксического действия препарата Виталанг-2 на клетки костного мозга мышей* проведено на 30 самцах C57Bl/6, исследование *генотоксического действия препарата Виталанг-2 на генеративные клетки мышей* - на 22 самцах C57Bl/6 и 150 самках мышей линии CBA/Lac. Возраст животных составлял 2 – 2,5 месяца, масса - 20-25 г. Мыши были получены из питомника Филиала «Столбовая» ФГБУ НЦБМТ РАМН (Московская обл., Чеховский район). До и во время эксперимента животные содержались группами при естественном освещении в условиях свободного доступа к воде и пище.

Метод оценки генотоксического действия препарата Виталанг-2 на клетки костного мозга мышей

Генотоксическое влияние препарата Виталанг-2 на соматические клетки определяли методом учета хромосомных aberrаций в клетках костного мозга мышей [9]. Суммарная доза препарата Виталанг-2 составляла 90 мг/кг, интраназально, в объеме 0,02 мл на мышшь.

Поскольку однократная доза препарата для введения мышам была ограничена растворимостью препарата Виталанг-2 и небольшими объемами введения (так как введение интраназальное), необходимая для изучения мутагенности доза препарата (90 мг/кг) достигалась трехкратным введением препарата в течение короткого временного промежутка (1 ч.). Циклофосфан в дозе 20 мг/кг вводили однократно внутривентриально в объеме 0,2 мл на 20 г массы тела животного, воду для инъекций вводили, как и препарат Виталанг-2, интраназально трехкратно в объеме 0,02 мл на мыш (отрицательный контроль). Время экспозиции составляло 24 ч. За 1,5 – 2 ч. до окончания экспозиции для накопления метафаз животным вводили внутривентриально 0,04% раствор колхицина по 0,2 мл на 20 г массы животного. Через 24 часа у животных после эвтаназии вымывали костный мозг из бедренной кости и готовили препараты метафазных хромосом по стандартной методике [10]. Для анализа у каждого животного отбирали по 100 клеток на стадии метафазы, в каждой клетке на стадии метафазы анализировали хромосомные aberrации – фрагменты и обмены. Статистическую обработку проводили с использованием t-критерия Стьюдента в преобразовании Фишера согласно рекомендациям [11, 12].

Метод оценки генотоксического действия препарата Виталанг-2 на генеративные клетки мышей

Препарат Виталанг-2 вводили интраназально в количестве 0,020 мл/мышь в дозе 90 мг/кг. В качестве позитивного контроля использовали циклофосфан, который вводили внутримышечно в дозе 30 мг/кг. Вода для инъекций являлась негативным контролем.

Самцов мышей, получивших препараты, спаривали с интактными самками в течение трех недель. Самок подсаживали еженедельно, по 3 самки на 1 самца.

На 16-17 день беременности самок подвергали эвтаназии, при вскрытии регистрировали количество живых, погибших эмбрионов, количество мест имплантации в обоих рогах матки, оценивали степень плодовитости по количеству желтых тел в яичниках.

Показатели предимплантационной и постимплантационной гибели эмбрионов оценивали по формулам:

Предимплантационная гибель: $(B-C)/B$

Постимплантационная гибель: B/C

Частоту возникновения доминантных леталей рассчитывали по формуле:

$$[1-(A/B_0) / (A/B_k)] * 100,$$

где **A** – количество живых эмбрионов,

B – количество мертвых эмбрионов,

B – количество желтых тел,

C – количество мест имплантации.

Для оценки значимости увеличения этого показателя в опыте, по сравнению с контролем, использовался критерий χ^2 для соотношения сумм живых и мертвых эмбрионов, рассчитанный по формуле:

$$\chi^2 = \frac{([ad - bc] - 0,5N)^2 N}{(a + b)(c + d)(a + c)(b + d)}$$

где a – мертвые эмбрионы, контроль;

b – мертвые эмбрионы, опыт;

c – живые эмбрионы, контроль;

d – живые эмбрионы, опыт; $N = a + b + c + d$.

1.4.2 Результаты исследования

Данные изучения генотоксического действия препарата Виталанг-2 на клетки костного мозга мышей

Результаты оценки цитогенетической активности препарата Виталанг-2 в тесте по учету хромосомных aberrаций в клетках костного мозга самцов мышей C57Bl/6 представлены в таблице 22. Из таблицы видно, что доля aberrантных клеток в опыте не превышает показателя негативного контроля, что является доказательством отсутствия цитогенетической активности исследуемого препарата.

Данные изучения генотоксического действия препарата Виталанг-2 на генеративные клетки мышей

Протокол учета показателей пред- и постимплантационной смертности, а также потенциальной плодовитости животных представлен в таблице 23. Анализ полученных данных свидетельствует о том, что достоверных различий между указанными показателями в группах животных, получавших Виталанг-2 и физиологический раствор, не обнаружено. Расчетный показатель величины доминантных летелей также достоверно не отличался в обеих группах животных. При этом используемый в качестве позитивного контроля циклофосфан обладал выраженным мутагенным эффектом на той же линии самцов C57Bl/6.

Количественные показатели доминантных летелей, возникающих после воздействия циклофосфана и препарата Виталанг-2, приведены в таблице 24.

Таблица 22 - Количество хромосомных aberrаций в клетках костного мозга мышей после воздействия препарата Виталанг-2

Препарат, доза	Экспозиция, ч.	Количество исследованных клеток	Количество aberrаций				Доля поврежденных клеток, %
			Одиночные фрагменты, %	Парные фрагменты, %	Обмены, %	Множественные aberrации, %	
Виталанг-2, 90 мг/кг	24	500	1	0	0	0	1
Вода для инъекций	24	500	1,2	0	0	0	1,2
Циклофосфан, 20 мг/кг	24	300	16	3	0,3	5,3	24,7 *

*-статистически значимое отличие от контроля, $p < 0,001$.

Таблица 23 - Влияние препарата Виталанг-2 на уровень доминантных летальных мутаций в зародышевых клетках самцов мышей

Стадия сперматогенеза	Препарат, доза	Кол-во беременных самок	Кол-во желтых тел	Кол-во мест имплантации	Кол-во живых эмбрионов	Кол-во мертвых эмбрионов	Величина эмбриональной смертности		Фертильность	Доминантные летали	Значение χ^2 статистики
							Пред импл.	После имплантации			
Стадия зрелых сперматозоидов	Контроль	15	123	95	89	6	0,23	0,06	0,20		
	Виталанг-2, 90 мг/кг	8	67	53	44	9	0,21	0,17	0,22	7,76	5,5
Стадия поздних сперматид	Контроль	12	102	78	75	3	0,24	0,04	0,21		
	Виталанг-2, 90 мг/кг	23	150	121	106	15	0,19	0,12	0,29	3,89	5,3
Стадия ранних сперматид	Контроль	26	218	166	151	15	0,24	0,09	0,36		
	Виталанг-2, 90 мг/кг	26	228	171	153	18	0,25	0,11	0,25	3,12	0,41

Таблица 24 – Значения χ^2 статистики при возникновении доминантных летальных мутаций в зародышевых клетках самцов мышей после воздействия препарата Виталанг-2 и циклофосфана

Стадии сперматогенеза	Виталанг-2, 90 мг/кг		Циклофосфан, 30 мг/кг	
	Доминантные летали, %	Значение χ^2 статистики	Доминантные летали, %	Значение χ^2 статистики
Зрелые сперматиды	7,76	5,5 *	21,79	15,34 **
Поздние сперматиды	3,89	5,3 *	37,12	40,54 **
Ранние сперматиды	3,12	0,41	8,35	4,37 *

Статистически значимые отличия от контроля: * - $p \leq 0,05$; ** - $p \leq 0,01$.

Введение препарата Виталанг-2 в дозе 90 мг/кг вызывало статистически значимое увеличение количества доминантных летелей в зародышевых клетках самцов C57Bl/6 на стадии зрелых и поздних сперматид при уровне значимости 0,05.

Таким образом, полученные данные свидетельствуют о потенциальном слабом генотоксическом влиянии препарата в дозе, значительно превышающей терапевтическую, на генеративные клетки мышей.

2 Оценка местно-раздражающего действия препарата Виталанг-2

2.1 Материалы и методы

Препарат. В экспериментах использовали препарат Виталанг-2, лиофилизат высокополимерной РНК для приготовления раствора для интраназального применения (серии 160611, 30 мг/флакон, ООО «Виталанг», г. Новосибирск).

Животные. Исследования проводили на 24 мышах линии BALB/c массой 18-22 г, самках, полученных из питомника ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор».

Метод изучения местно-раздражающего действия

Препарат вводили интраназально (1 и 10 мг/кг) в объеме 0,025 мл (по 0,0125 мл в каждый носовой ход), однократно. Контрольным животным в те же сроки вводили воду для инъекций в эквивалентном объеме. Через 24 часа после введения препарата мышам выводили из эксперимента мгновенной дислокацией шейных позвонков, забирали образцы тканей носовой полости и подчелюстной лимфоузлы для гистологического исследования.

2.2 Результаты исследования

В ходе патоморфологического исследования носовой полости и подчелюстных лимфоузлов экспериментальных животных макроскопических изменений в структуре органов не обнаружено, структура и строение органов контрольных и опытных мышей соответствовала норме.

Светооптическое исследование гистологического материала носовой полости мышам, получавшим интраназально препарат Виталанг-2, патологических изменений в эпителиальной выстилке носовой полости не выявило. В эпителиальном покрове слизистой оболочки носовой полости животных опытных групп патологически измененных клеток не наблюдалось. Наличие небольшого числа лейкоцитов в толще эпителиального покрова не может расцениваться как патологическое явление, поскольку характерно и для нормальной гистологической картины этих структур. В подлежащих тканях видимых патологических изменений также не обнаружено.

В структуре подчелюстных лимфоузлов мышей опытных групп изменений не наблюдалось. Как у контрольных, так и опытных мышей гистологическое строение лимфоузла не отличалось от привычной для мышей картины.

Таким образом, препарат Виталанг-2 не оказывал местно-раздражающего действия при однократном интраназальном введении мышам в дозах 1 и 10 мг/кг.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Установлено, что введение препарата Виталанг-2 в предполагаемой терапевтической дозе 1 мг/кг в течение всего периода беременности не приводит к повышению показателей пре- и постимплантационной смертности, не оказывает существенного влияния на процесс формирования костной системы плодов крыс, но повышает число кровоизлияний во внутренние органы и ткани эмбрионов, что может быть связано с повышением под действием препарата проницаемости сосудов. В дозе, десятикратно превышающей терапевтическую (10 мг/кг), Виталанг-2 оказывал токсическое действие на процесс эмбрионального развития, которое проявлялось в увеличении количества плодов с гематомами, аномалиями развития внутренних органов и скелета.

Введение препарата беременным самкам крыс в дозе 10 мг/кг с 6 дня беременности до родов не оказывало существенного влияния на показатели физического развития, сроки формирования безусловных рефлексов потомства в течение периода вскармливания. Не обнаружено значительных изменений в показателях условно-рефлекторной деятельности, функции интегральных физиологических систем, уровне гематологических и биохимических показателей, состоянии внутренних органов взрослых потомков. В то же время введение препарата самкам крыс в дозе, десятикратно превышающей терапевтическую, приводило к повышению ранней постнатальной смертности потомков-самцов.

Иными словами, препарат Виталанг-2 в предполагаемой терапевтической дозе выраженных эмбриотоксических и тератогенных свойств не проявлял. В дозе, в 10 раз превышающей терапевтическую, препарат оказывал токсическое действие на процесс эмбрионального развития.

Не обнаружено иммунотоксических свойств препарата Виталанг-2 при его однократном интраназальном введении мышам в дозах 1 и 10 мг/кг.

Оценка алергизирующего действия препарата Виталанг-2 на мышах и морских свинках показала, что препарат в дозе 1 мг/кг не проявлял алергизирующих свойств. Данные, полученные при изучении свойств препарата в дозе, в 10 раз превышающей терапевтическую, свидетельствуют о возможности индукции алергической реакции немедленного типа.

В ходе изучения мутагенных свойств препарата Виталанг-2 показано отсутствие у препарата цитогенетической активности на клетках костного мозга мышей. В дозе, значительно превышающей терапевтическую (90 мг/кг) препарат оказывал слабый генотоксический эффект на генеративные клетки.

Препарат Виталанг-2 при однократном интраназальном введении мышам в терапевтической дозе и дозе, 10-кратно превышающей терапевтическую, местно-раздражающим действием не обладал.

СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННОЙ ЛИТЕРАТУРЫ

1. Отчет о научно-исследовательской работе «Разработка метода получения ветеринарного препарата высокополимерной РНК, обладающего противовирусным действием» по теме: Изучение параметров токсичности и пирогенности, оценка биологической активности ветеринарного препарата высокополимерной РНК, Этап второй, 2011-1.2-512-007-044 Государственный контракт от «11» февраля 2011г. № 16.512.11.2018, ФЦП «Исследования и разработки по приоритетным направлениям развития научно-технического комплекса России на 2007-2012 годы»
2. Руководство по экспериментальному (доклиническому) изучению новых фармакологических веществ. М., 2005.
3. Методы экспериментального исследования по установлению порогов действия промышленных ядов на генеративную функцию с целью гигиенического нормирования. Методические рекомендации. М., 1978. 11 с.
4. Лабораторные методы исследования в клинике. /Под.ред. Меншикова В.В. - М, 1987.
5. Rook G.A., Steel J., Umar S., Dockrell H.M. A simple method for the solubilisation of reduced NBT, and its use as a colorimetric assay for activation of human macrophages by gamma-interferon. // J. Immunol. Methods. – 1985.- Vol.82 , №1.- P.161-167.
6. Kitamura K. A footpad weight assay method to evaluate delayed-type hypersensitivity in the mouse// J. Immunol Methods. - 1980. - Vol. 39, № 3. - P.277-283.
7. Иммунологические методы/ под ред. Г.Фримеля, М: «Москва», 1987.
8. Weigle W.O., Cochrane C.G., Dixon F.J. Anaphylactogenic properties of soluble antigen-antibody complex in guinea pig and rabbit// J. Immunol. - 1960. - Vol. 85. - P.469-77.
9. Определение мутагенности химических соединений (генетический скрининг) на лабораторных мышах: Методические указания.- М:Медицина,1977.-12 с.
10. С.Е.Ford, J.L.Hamilton. //Stain Technol. - 1956. - Vol.31. - P. 47.
11. Бейли Н. Статистические методы в биологии. М: Мир, 1964.- С. 271.
12. Статистическая обработка данных тестирования на мутагенность. Методические указания. Вильнюс, 1989.