

СИСТЕМА МОНИТОРИНГА СПЕЦИФИЧЕСКОЙ ТОКСИЧНОСТИ ЛЕКАРСТВЕННЫХ СРЕДСТВ НА ПРИМЕРЕ КРОВЕЗАМЕНИТЕЛЯ ЛАДПУЛИН

Н.И. Мельнова, В.Н. Гапанович, Е.Л. Спиридонова, И.Н. Жук, О.А. Потапова

ИТЦ РУП «МБИ», г. Минск, Беларусь, *mbigapa@rumbler.ru*

Одним из этапов разработки лекарственных препаратов является оценка их потенциальных токсикологических свойств, что подразумевает не только определение LD₅₀ и изучение хронической токсичности, но и анализ отдаленных последствий фармакологического использования новых средств, включая методы исследования возможных мутагенных, канцерогенных, эмбриотоксических и тератогенных эффектов.

Нами отработана система поэтапного мониторинга специфических видов токсичности разрабатываемых лекарственных препаратов, которая состоит из:

- выявления потенциальных мутагенов с помощью микроядерного теста и/или учета хромосомных aberrаций в культивируемых лимфоцитах человека;
- количественной оценки действия предполагаемого мутагена на организменном уровне по анализу aberrаций хромосом в клетках костного мозга линейных мышей и/или учету доминантных летальных мутаций (ДЛМ);
- анализа канцерогенной активности по учету аденом легких у линейных мышей;
- оценки тератогенных и эмбриотоксических свойств на крысах линии Вистар.

Рассмотрим схему поэтапной оценки специфических видов токсичности на примере нового гемокорректора ладпулин (РУП «Белмедпрепараты»), который представляет собой 6% водный раствор радиационно-химически модифицированного ферментативно расщепляемого полисахарида пуллулан с молекулярной массой 60000±10000, синтезируемого дрожжеподобным штаммом *Auerobasidium* (*Pullularia*) *pullulans* и способного подвергаться биоконверсии в организме системой амилолитических ферментов и 0,9% натрия хлорида (NaCl)

Мутагенную активность оценивали на клеточном (микроядерный тест, влияние на частоту хромосомных aberrаций в культивируемых лимфоцитах человека) и организменном (частота хромосомных aberrаций в клетках костного мозга линейных мышей, учет ДЛМ) уровнях.

Постановку микроядерного теста осуществляли на лимфоцитах периферической крови человека. При анализе биядерных клеток и наличия в них микроядер придерживались рекомендаций Huber R. et al. (1983). Внесение субстанции ладпулина в среду культивирования лимфоцитов в количестве, превышающем содержание пуллулана в суточной терапевтической дозе в 15 раз, не вызывало по сравнению с контролем (клетки без исследуемого препарата) увеличения количества клеток с микроядрами (табл. 1), а также не снижало митотическую активность лимфоцитов и не вызывало увеличения количества aberrаций хромосом (табл. 2).

Таблица 1
Влияние пуллулана на частоту встречаемости микроядер в лимфоцитах периферической крови человека

Серия опыта	Количество проанализированных биядерных клеток	Количество клеток с микроядрами	% клеток с микроядрами
Контроль	2060	3	0,15±0,085
Пуллулан	3048	3	0,10±0,057

Таблица 2

Влияние пуллулана на частоту aberrаций хромосом лимфоцитов периферической крови человека

Серия эксперимента	Количество проанализированных клеток	% клеток с aberrациями	Из них клеток с	
			одиночными фрагментами	парными фрагментами
Контроль	740	1,62±0,464	10	2
Пуллулан	270	1,48±0,735	4	–

Внутривенное введение мышам лекарственной формы нового гемокорректора ни в одной из использованных доз (превышение суточной терапевтической в 5 и 15 раз) не вызывало увеличения количество клеток с aberrациями хромосом по сравнению с отрицательным контролем (0,9% NaCl, 1 мл/мышь, внутривенно). Aberrации хромосом в этих сериях эксперимента были представлены только одиночными фрагментами, а их число на одну клетку было сопоставимым при выключении животных из эксперимента через 24 и 48 часов после введения препаратов, соответственно. Не было зарегистрировано ни одной клетки со множественными aberrациями хромосом. В свою очередь, у мышей с введением уретана (1,5 мг/г, внутривентрально), в клетках костного мозга процент метафаз с aberrациями хромосом уже через 1 сутки был более чем на порядок выше, чем у животных с введением различных доз ладпулина. Кроме того, наблюдалось большое количество клеток с несколькими aberrациями хромосом, о чем свидетельствовал значительно повышенный показатель “число aberrаций хромосом на одну клетку”.

Следующим этапом оценки мутагенных свойств кровезаменителя ладпулин стало изучение воздействия его полимерной основы на половые клетки мышей с помощью метода учета ДЛМ. Проведенное исследование не выявило каких-либо значимых отклонений по анализируемым показателям (среднее число живых эмбрионов на самку, среднее число резорбций на самку, смертность эмбрионов после имплантации) между животными опытной и контрольной серий, указывая на отсутствие у радиационно-модифицированного полисахарида способности инициировать образование ДЛМ в зародышевых клетках, т.е. и в этом тесте субстанция ладпулина не проявляла мутагенных свойств.

Установление факта отсутствия у пуллулана мутагенных эффектов в тестах *in vivo* и *in vitro* послужило отправным моментом для определения последующего алгоритма изучения его канцерогенных свойств. Данное исследование было выполнено на мышах линии Af в сравнении с положительным (уретан, 1,5 мг/г) и отрицательным (0,9% NaCl; РУП «Белмедпрепараты»; 1 мл/мышь) контролями. Оказалось, что внутривенное на протяжении 10 дней ежедневное введение исследуемого препарата в дозе, превышающей суточную терапевтическую в 15 раз, равно как и инъекции по аналогичной схеме 0,9% NaCl, обладали в анализируемом тесте схожим действием, тогда как однократное внутривентральное введение уретана способствовало значительному увеличению количества экспериментальных животных с аденомами легких (73,91±9,156%), вызывая более чем 10-кратное превышение показателя “среднее число аденом на мышь” (у отдельных особей количество солидных опухолей достигало 5-7) относительно серии с введением 0,9% NaCl и ладпулина.

Данные краткосрочных тестов на мутагенность и результаты исследования в среднесрочном тесте по изменению количества аденом легких у мышей доказывают отсутствие канцерогенных свойств у нового кровезаменителя, разработанного на

основе ферментативно расщепляемого радиационно-модифицированного полисахарида пуллулан.

Таблица 3

Канцерогенная активность кровезаменителя ладпулин

Серия эксперимента	Количество мышей в серии	Количество мышей с аденомами		Количество аденом в серии	Среднее число аденом на мышшь
		n	%		
Уретан	23	17	73,91±9,156***	56	2,43
0,9% NaCl	30	4	13,33±6,210	4	0,13
Ладпулин	28	3	10,71±5,844	3	0,11

Примечание: *** – достоверность различий по отношению к серии животных с введением 0,9% NaCl или ладпулина, соответственно, при уровне значимости $P < 0,05$.

Еще одним важным аспектом учета отдаленных последствий воздействия лекарственных средств на организм является выявление врожденных пороков развития и повышение общей эмбриональной смертности. Поэтому исследование новых лекарственных препаратов на наличие возможных тератогенных и эмбриотоксических свойств является неперенным условием профилактики эмбриопатий. В наших исследованиях мы придерживались принципов испытания лекарственных средств, составленных на основании опыта работы Отдела эмбриологии ИЭМ АМН РФ.

Было установлено, что внутривенное введение в различные периоды беременности кровезамещающего раствора ладпулин (в 5-кратной суточной терапевтической дозе, 3-кратно с интервалом 24 часа) и используемого в качестве контроля 0,9% NaCl (по той же схеме, 3 мл/крысу) не вызывало отклонений в развитии и расположении внутренних органов, а также элементов костной системы эмбрионов крыс, что свидетельствовало об отсутствии у разработанного лекарственного средства тератогенных свойств. Детальный анализ показателей эмбриогенеза (количество желтых тел, эмбрионов и резорбций, размер плода, вес его и плаценты) и их производных (смертность до и после имплантации, общая эмбриональная смертность, выживаемость) также указывал на отсутствие у ладпулина эмбриотоксических свойств (табл. 4).

Таблица 4

Некоторые показатели эмбриотоксичности кровезаменителя ладпулин

Период беременности	Общая эмбриональная смертность (%)		Выживаемость (%)	
	Ладпулин	0,9% NaCl	Ладпулин	0,9% NaCl
1-4 день	25,3	33,3	74,7	66,7
5-8 день	21,3	42,1	78,7	57,9
8-11 день	7,7	37,4	92,3	62,6
12-15 день	21,4	39,4	78,6	60,6
16-19 день	16,5	53,3	83,5	46,7

Таким образом, использование поэтапной системы комплексного мониторинга специфических видов токсичности полимерной основы и готовой лекарственной формы нового кровезамещающего раствора ладпулин позволило установить отсутствие у них проявлений мутагенных, канцерогенных, тератогенных и эмбриотоксических свойств, доказать биологическую безвредность разработанного фармсредства и возможность использования радиационно-химически модифицированного пуллулана в производстве различных лекарственных препаратов.