

УДК 619:616.9:636.22/28:615.2

КОВАЛЕНКО В.Л., д-р вет. наук; **ЯМЦУН Т.С.**, аспірант

РОЗУМНЮК А.В., канд. вет. наук

ГНАТЕНКО А.В., ЧЕХУН А.І., наукові співробітники

Інститут ветеринарної медицини НААН України

**ДОКЛІНІЧНІ ВИПРОБУВАННЯ ІМУНОМОДУЛЮВАЛЬНОГО
ПРЕПАРАТУ АРСЕЛАН НА ЛАБОРАТОРНИХ МИШАХ**

У статті описується проведення токсикологічного контролю ветеринарних препаратів, що запобігає можливим порушенням обміну речовин, негативному впливу на органи і тканини, виникненню побічних дій і віддалених наслідків, створює передумови для визначення оптимальних терапевтичних доз, способів та термінів застосування, шляхів і часу виведення з організму, що, в свою чергу, сприяє розробці нових високоефективних конкурентно спроможних препаратів. Імуномодулювальний препарат Арселан у дозах 50, 100, 200, 400, 600, 800 та 1000 мг/кг за внутрішньошлункового введення білим мишам не проявив токсичної дії, жодна тварина не загинула (LD₀ становить 5 г/кг маси тіла). Показники морфологічного складу крові після застосування арселану лабораторним тваринам знаходилися в межах норми. У мишей усіх дослідних груп спостерігали тенденцію до збільшення кількості еритроцитів і зростання концентрації гемоглобіну.

Ключові слова: арселан, гостра токсичність, LD₅₀, LD₁₀₀.

Постановка проблеми. У зв'язку з постійним імпортом сільськогосподарських і дрібних свійських тварин останнім часом в Україні почали реєструвати більшу кількість аутоімунних, алергічних, інфекційних (вірусних, бактеріальних) захворювань як з гострим, так і хронічним перебігом. Нові хвороби спричиняють значні матеріальні збитки тваринництву. Застосування стандартних схем лікування не завжди дає бажаний ефект, зокрема використання антибіотиків й інших хімотерапевтичних препаратів. Останні часто лише пригнічують розмноження збудника захворювання, а кінцева його елімінація з організму є результатом діяльності факторів імунітету організму тварин. У разі недостатньої імунореактивності дія антибактеріальних, протигрибкових і противірусних засобів буде малоефективною. Тому нині різко зріс інтерес до препаратів, які впливають на імунітет – імуномодуляторів.

Лікарський препарат можна віднести до групи імуномодуляторів, якщо доведена його здатність змінювати імунологічну реактивність, залежно від її початкового стану, та показники імунітету. Для цього досліджуваний препарат має пройти доклінічні випробування [1]. Однією з вимог до потенційних лікарських препаратів є визначення співвідношення між їх ефективністю та токсичністю [2–5]. Більшість негативних проявів застосування препаратів можна передбачити за результатами виконаних клінічних випробувань з наступним терапевтичним застосуванням. Це дозволяє забезпечити нешкідливість нових лікарських засобів [6, 7]. Вивчення безпеки потенційних ліків, зокрема гострої токсичності, є одним з найважливіших етапів розробки нових препаратів [8, 9]. Проведення доклінічного вивчення лікарських засобів здійснюється на підставі Інструкції «Лікарські засоби. Належна лабораторна практика», затвердженої наказом Міністерства охорони здоров'я України від 16.02.2009 № 95 «Про затвердження документів з питань забезпечення якості лікарських засобів» [10].

Мета та завдання дослідження – провести доклінічні випробування імуномодулювального препарату Арселан: визначити гостру токсичність та виявити можливу шкідливість препарату за одноразового введення в організм тварин; встановити максимальні терапевтичні, токсичні та летальні дози.

Матеріали і методи дослідження. Орієнтовні дози препарату для мишей розраховували залежно від шляху введення (за К.К. Сидоровим, 1973; табл. 1).

Таблиця 1 – Максимально допустимий об'єм рідин (см³) для білих лабораторних мишей залежно від шляху введення

Вид тварин	білі миші	
Маса тіла, г	20–25	
Вік	4 тижні	
Шлях введення	- у шлунок, см ³	0,5 (25 і більше г)
	- під шкіру, см ³	0,8–1,0
	- внутрішньом'язово, см ³	0,5

Для токсикологічного дослідження використовували статевозрілих, клінічно здорових білих мишей, годували їх стандартним гранульованим кормом за нормами, згідно із правилами [6]. Перед постановкою досліду за мишами спостерігали 14 діб.

Гострий дослід розпочали з установлення рівня смертельних доз. Для цього 5 білим мишам одноразово вводили арселан у дозах: 50, 100, 200, 400 та 600 мг/кг і спостерігали за ними упродовж трьох діб. Жодна тварина не загинула.

Другим етапом дослідження було визначення максимальної перенесеної дози препарату, яке проводили на 6 групах клінічно здорових безпородних білих мишей (по 10 у кожній). Мишам п'яти дослідних груп препарат вводили в шлунок у дозах 200, 400, 600, 800 і 1000 мг/кг відповідно, контрольної (шостій групі) – лише розчинник. Препарат вводили у максимально можливому об'ємі для кожної миші через кожні 1,5 години, 5 разів упродовж 9 годин. За такої схеми застосування ввели максимально допустимі об'єми препарату [6]. Таким чином, добові дози арселану в 5 дослідних групах становили 1000, 2000, 3000, 4000 і 5000 мг/кг. Перед початком кожного етапу досліду тварин упродовж 3–4 годин витримували на голодній дієті.

За тваринами ретельні спостереження проводили упродовж 14 діб, відмічаючи в динаміці зміни їхнього клінічного стану.

Результати дослідження та їх обговорення. За результатами другого етапу досліджень упродовж першої доби, після введення препарату в дозі 5000 мг/кг (п'ята дослідна група), в мишей спостерігали пригнічення загального стану (в'ялість), сповільнену реакцію на зовнішні подразники, анорексію, тахіпное, тремор, незначну гіперемію вух і лап. Такий стан у дослідних мишей тривав близько 4 годин, після чого спостерігали відновлення природного стану, жодна тварина не загинула. Кожні 2 доби мишей усіх груп зважували. Виявили, що навіть у п'ятій дослідній групі після закінчення експерименту маса мишей була на 7 г більшою, ніж у контролі, різниця становила 26 % (рис. 1).

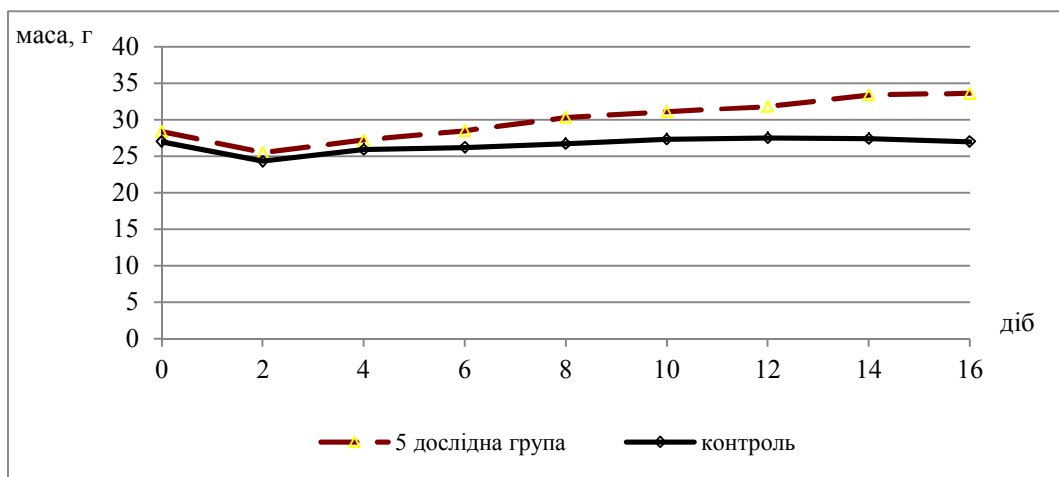


Рисунок 1. Зміна маси тіла лабораторних мишей за внутрішньошлункового введення арселану

Проведені дослідження вказували, що доза, яка не викликала загибелі тварин за внутрішньошлункового введення (LD_0), складала 5000 мг/кг маси тіла, а введення вищої дози неможливе через фізіологічні особливості мишей (мала маса тіла). Згідно з ГОСТ 12.1.007-76 можна зробити висновок, що препарат арселан є нетоксичним для тварин.

Аналіз результатів експерименту показав, що в дослідних (1–4) групах маса тіла лабораторних мишей, як і в 5-й, не тільки не зменшувалася після застосування арселану, а навпаки – почала зростати вже з 6-ї доби, тобто імуномодулювальний препарат Арселан не має шкідливого впливу на мишей, стимулює обмін речовин, що в свою чергу сприяє збільшенню маси тіла тварин.

Нами було проведено дослідження стану деяких показників периферичної крові білих мишей у разі застосування арселану (табл. 2).

На 7 і 14 добу після введення препарату лабораторним тваринам показники морфологічного складу крові знаходилися в межах норми. Швидкість осідання еритроцитів (ШОЕ) не змінювалася упродовж усього експерименту і становила 1 мм у всіх дослідних групах як на 7-му, так і 14-ту добу. Не було відмічено змін і в кількості тромбоцитів периферичної крові тварин (табл. 2). У мишей усіх дослідних груп спостерігали тенденцію до збільшення кількості еритроцитів і

зростання концентрації гемоглобіну, що вказувало на стимулювальний вплив арселану на еритроцитопоез. Гематокритна величина мала тенденцію до зростання лише в 4 і 5-й дослідних групах, де вводились найбільші кількості імуномодулювального препарату. Зважаючи на отримані результати дослідження периферичної крові тварин, можна передбачити, що арселан сприяє стимуляції обміну речовин в організмі.

Таблиця 2 – Морфологічний склад крові мишей після введення арселану ($M \pm m$; $n=12$)

Група	Еритроцити, Т/л		Гемоглобін, г/л		Тромбоцити, Г/л		Гематокрит, %	
Норма	8,7–10,5		120–149		730		42–46	
Доба	7	14	7	14	7	14	7	14
1	7,3±0,12	8,5±0,79	113±6,1	113±4,7	392±14,5	413±10,4	35±1,4	36±0,9
2	7,5±0,20	8,5±0,41	105±5,2	111±5,1	282±18,1	289±11,5	42±1,6	42±1,2
3	7,7±0,50	9,4±0,28	116±3,4	117±5,7	442±12,3	439±13,8	48±1,8	47±1,3
4	7,9±0,11	9,9±0,12	134±4,6	131±3,8	351±28,0	368±12,7	40±1,4	45±0,8
5	8,3±0,58	10,3±0,20	112±3,8	140±4,2	455±30,1	461±25,2	41±1,2	46±1,3
Контроль	9,5±0,22	9,5±0,36	125±5,1	124±3,6	585±14,7	589±16,3	36±1,3	37±0,8

Висновки. В результаті проведених досліджень встановлено, що імуномодулювальний препарат Арселан у дозах 50, 100, 200, 400, 600, 800 та 1000 мг/кг за внутрішньошлункового введення білим мишам не проявив токсичної дії, жодна тварина не загинула (LD_{50} становить 5000 мг/кг маси тіла тварини; ГОСТ 12.1.007-76). Тенденція до збільшення кількості еритроцитів і зростання концентрації гемоглобіну в крові дослідних тварин, яким застосовували арселан, вказує на стимулювальний вплив препарату на еритроцитопоез.

Перспективним напрямом наших досліджень буде підбір терапевтичних доз арселану для продуктивних тварин, а також дослідження впливу імуномодулятора на зміни природної резистентності великої рогатої худоби і свиней.

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Стефанов О.В. Доклінічні дослідження лікарських засобів: Методичні рекомендації / О.В. Стефанов. – Київ: Авіценна, 2001. – 528 с.
2. Доклінічні дослідження ветеринарних лікарських засобів / [І.Я. Коцюмбас, О.Г. Малик, І.П. Патерега та ін.]; За ред. І.Я. Коцюмбаса. – Львів: Тріада плюс, 2006. – 360 с.
3. Preclinical assessment of the efficacy of mycograb, a human recombinant antibody against fungal HSP90 / [R.C. Matthews, G. Rigg, S. Hodgetts at all] // Antimicrob Agents Chemother, 2003. – Vol. 47. – P. 2208–2216.
4. Employment of adult mammalian primary cells in toxicology: In vivo and in vitro genotoxic effects of environmentally significant N-nitrosodialkylamines in cells of liver, lung and kidney / [B.L. Pool, S.Y. Brendler, U.M. Liegibel at all] // Environmental Molecular Mutagenesis. – 1990. – Vol. 15. – P. 24–35.
5. Faqi A.S. A Comprehensive Guide to Toxicology in Preclinical Drug Development / A.S. Faqi. – Imprint: Academic Press, 2012. – 1024 p.
6. Вивчення лікарських засобів та експертизи матеріалів доклінічного вивчення лікарських засобів: Наказ МОЗ України від 14.12.2009 № 944 – Режим доступу: <http://zakon.rada.gov.ua/cgi-bin/laws/main.cgi?nreg=z0053-10/>.
7. Лойт А.О. Профилактическая токсикология: Руководство для токсикологов-экспериментаторов / А.О. Лойт, М.Ф. Савченков. – Иркутск: Изд-во Иркут. ун-та, 1996. – 279 с.
8. ГОСТ 12.1.007-76.ССБТ. Вредные вещества. Классификация и общие требования безопасности. – Введ. 01.01.77; Проверен 01.10.81; Изменён № 1; Переиздан 01.12.81. – М.: Изд-во стандартов, 1982. – 6 с.
9. Косенко М.В. Токсикологічний контроль нових засобів захисту тварин [метод. реком.] / М.В. Косенко, О.Г. Малик, І.Я. Коцюмбас – К., 1997. – 33 с.
10. Хаитов Р.М. Отечественные иммуотропные лекарственные средства последнего поколения и стратегия их применения / Р.М. Хаитов, Б.В. Пинегин, Т.М. Андронов // Фармакология. – К., 2002. – 130 с.

Доклинические испытания иммуномодулирующего препарата Арселан на лабораторных мышах

В.Л. Коваленко, Т.С. Ямцун, А.В. Розумнюк, А.В. Гнатенко, А.В. Чехун

В статье утверждается, что проведение токсикологического контроля ветеринарных препаратов предотвращает возможные нарушения обмена веществ, отрицательное влияние на органы и ткани, возникновение побочных действий и отдалённых последствий, создающее предпосылки для определения оптимальных терапевтических доз, способов и сроков применения, путей и времени выведения из организма, что, в свою очередь, способствует разработке новых высокоэффективных конкурентных препаратов. Иммуномодулирующий препарат Арселан в дозах 50, 100, 200, 400, 600, 800 и 1000 мг/кг при внутрижелудочном введении белым мышам не проявляет токсического действия, ни одно животное не погибло (LD_{50} – 5 г/кг массы тела). Показатели морфологического состава крови после применения арселана лабораторным животным находились в пределах нормы. У мышей всех опытных групп наблюдали тенденцию к увеличению количества эритроцитов и концентрации гемоглобина.

Ключевые слова: арселан, острая токсичность, LD_{50} , LD_{100} .