

*Ю.И. Губский, И.Ф.Беленичев, Е.Л. Левицкий, А.Г. Горюшко,
А.Н. Марченко, И.С. Коваленко, И.С. Татьяченко,
Л.П. Бабенко, А.Н. Величко, В.О. Никитин*

ИССЛЕДОВАНИЯ ГЕНОМОЗАЩИТНОГО ДЕЙСТВИЯ S- СОДЕРЖАЩИХ ПРОИЗВОДНЫХ ХИНАЗОЛОНОВ И ПИРИМИДОХИНАЗОЛОНОВ В УСЛОВИЯХ IN VITRO.

В экспериментах in vitro на белых крысах-самцах линии Вистар с токсическим поражением печени тетрахлолорметаном показана способность производных хиначолонов (S-содержащих гетеро-циклических соединений и пиримидохиначолонов) ингибировать процессы спонтанного и индуцированного липоперекисления, изменять скорость накопления малонового диальдегида в изолированных фракциях репрессированного и транскрипционно активного хроматина клеток печени, осуществлять структурную модификацию негистоновых белков, гистонов и ДНК в данных фракциях, коррекцию нарушений ряда физико-химических и структурно-динамических показателей, характеризующих степень спирализации ДНК, структуру негистоновых белков и гистонов.

УДК 615.9; 611- 013.9; 591.3; 612.64; 611 — 012

*Т.А. Бухтиарова, д.м.н.О.В. Сергиенко,
к.м.н., А.В.Матвиенко, к.м.н., В.С.Хоменко, к.м.н.,
В.Ф.Даниленко, к.ф.н., З.П.Омельяненко, к.м.н.,
И.Л.Сопина, к.б.н., О.Е.Ядловский, к.б.н.,
Т.В.Шатыркина, к.м.н.*

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ ВЛИЯНИЯ АМИЗОНА НА РЕПРОДУКТИВНУЮ ФУНКЦИЮ

Институт фармакологии и токсикологии АМН Украины, Киев

Амизон — лекарственный препарат, который относится к группе нестероидных противовоспалительных средств (НПВС), производное изоникотиновой кислоты с широким спектром фармакологических свойств. Амизон оказывает противовоспалительное, жаропонижающее, анальгезирующее действие, которое сочетается с иммуномодулирующим и интерферогенным эффектами. Поэтому препарат используется в комплексном лечении целого ряда заболеваний [1-8].

Большинство НПВС не лишены побочного действия. Наиболее часто встречающимися являются поражение желудочно-кишечного тракта (язвеногенное действие), гемато-

токсичность (агранулоцитоз), гепатотоксичность и т.п. [9,11].

Низкая токсичность и отсутствие побочных эффектов позволяет применять амизон в педиатрической практике, у женщин репродуктивного возраста, поэтому целью данных исследований было изучение эмбриотоксических свойств препарата и его влияния на репродуктивную функцию самок животных.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Действие амизона на репродуктивную систему определяли на основе морфологического и функционального анализа состояния яичников, а также биологического тестирования фертильности самок белых

Наиболее выраженные геномозащитные свойства отмечены для производных S-содержащих хиначолонов (NKC-150, NKC-153, NC-109) и пиримидохиначолонов. Обсуждается возможный механизм геномозащитного действия данных соединений.

*Yu.I.Gubskiy, I.F.Belenichev, E.L.Levitsky, A.G.Goriushko,
A.N.Marchenko, S.I.Kovalenko, I.S.Tatjanchenko, L.P.Babenko,
A.N.Velichko, V.A.Nikitin*

STUDY OF GENOMOPROTECTIVE ACTION OF S- DERIVATIVES OF HYNAZOLONES AND PIRIMIDO- HYNAZOLONES IN VITRO

Using transcriptionally active and repressed chromatin fractions of liver cells from intoxicated by tetrachloromethane males Wistar rats, the genomoprotective action of S-derivatives of hynazolones and pirimidohynazolones in vitro has been shown. The substances NKC-150, NKC-153 and NC-109 have the most pronounced genomoprotective activity.

крыс при внутрижелудочном введении препарата.

Изучение гонадотропного, эмбриотоксического и тератогенного эффекта проведено согласно [11].

Исследования проведены на 210 белых крысах — самках линии Вистар с массой тела 190 — 220 г в условиях полноценного, предусмотренного нормами, пищевого и водного рациона.

Одним из экспериментальных методов, позволяющим судить о функции яичников, является изучение эстрального цикла. Циклические изменения функции яичников связаны с ритмически происходящими в них процессами (созревание фолликулов, овуляция, образование желтых тел).

Перед началом эксперимента у всех животных исследовали эстральный цикл на протяжении 2 недель с помощью общепринятого метода ежедневного изучения вагинальных мазков. Животных с нарушенным циклом из опыта исключали.

Экспериментальных животных распределяли по сериям. Первую серию составили 28 самок, которые были разделены на 4 группы по 7 животных в каждой. Самкам 1-й, 2-й и 3-й группы ежедневно однократно в течение 15 сут внутрижелудочно при помощи металлического зонда вводили амизон в виде водной суспензии в дозах, соответствующих терапевтической — 68 мг/кг; 5-ти кратной терапевтической — 340 мг/кг и 10-ти кратной терапевтической 680 мг/кг массы тела. Четвертой

— контрольной группе животных вводили дистиллированную воду в аналогичных объемах.

При ежедневном исследовании вагинальных мазков оценивали влияние амизона на продолжительность всего цикла, отдельных его стадий и число нормальных циклов у каждой самки в течении 15 дней.

После окончания эксперимента самок в стадии эструса умерщвляли дислокацией шейных позвонков, вскрывали, выделяли левый яичник, фиксировали его в жидкости Карнуа, заливали в парафин, изготавливали по 30 серийных срезов толщиной 6 мкм с каждого яичника на ротационном микротоме. Гистологические срезы окрашивали гематоксилином и эозином. Подсчет абсолютного количества премордиальных фолликулов с одним слоем гранулезных клеток проводили в каждом 10-м срезе, а результат умножали на 10. Фолликулы с двумя и более слоями гранулезных клеток и зрелые фолликулы (графовы пузырьки) подсчитывали в каждом пятом срезе, а желтые тела учитывали в средних срезах. Подсчет структурно — функциональных элементов проведен в 660 срезах органа животных каждой экспериментальной группы.

Вторую серию животных составили 182 самки, которых также разделили на 4 группы. Животным 1-й, 2-й и 3-й группы ежедневно однократно в течении 15 дней внутрижелудочно с помощью зонда вводили водную суспензию амизона в дозах 68; 340 и 680 мг/кг массы тела. Контрольной группе самок вводили дистиллированную воду.

После окончания введения препарата самок подсаживали к интактным самцам в соотношении 2:1 на 2 эстральных цикла. Факт беременности устанавливали по наличию сперматозоидов во влагалищном мазке на фоне стадии эструса. Наличие сперматозоидов во влагалище крыс принимали за нулевой день беременности.

Часть самок подвергали эвтаназии (дислокация шейных позвонков) на 20-й день беременности. На вскрытии в яичниках подсчитывали желтые тела, в матке — количество живых и погибших плодов, число мест имплантации. Живые плоды тщательно осматривали под бинокулярной лупой, определяли их массу и кранио-каудальные размеры.

Критериями эмбриотоксического действия амизона считали:

- эмбриональную пред — и постимплантационную гибель;
- отставание в развитии, проявляющееся уменьшением массы тела и кранио-каудальных размеров плодов;
- нарушения развития головного мозга и внутренних органов;
- нарушение постнатального развития.

Предимплантационную эмбриональную гибель рассчитывали по разнице между числом желтых тел в яичнике и числом мест имплантации в матке. Постимплантационную гибель плодов определяли по разнице между количеством мест имплантации и числом живых плодов. Определяли также общую эмбриональную смертность, размер помета, количество живых плодов.

Две третьих общего числа плодов фиксировали в 96 % спирте для последующего анализа костной системы по методу Доусона. Остальные плоды (1/3 общего числа) помещали в жидкость Буэна для изучения состояния головного мозга и внутренних органов по методу Вильсона.

Другую часть самок оставили для родов с целью изучения возможного эмбриотоксического действия амизона, проявляющегося в постнатальном периоде развития потомства. За 4 дня до родов самок рассаживали в индивидуальные клетки.

Новорожденных крысят тщательно осматривали, наблюдали за их физическим развитием до окончания вскармливания, регистрировали кранио — каудальные размеры, определяли массу их тела. Учитывали все случаи гибели крысят с момента рождения до прекращения вскармливания.

Изучали скорость созревания некоторых сенсорно — двигательных рефлексов в период вскармливания крысят (со 2-го по 10-й день). Эмоционально — двигательное поведение и способность к тонкой координации движений крысят оценивали по методу "открытого поля": исследовали латентный период, двигательную активность, горизонтальную и вертикальную активность, груминговые реакции, эмоциональность. Каждый тест исследовали по 3 мин в одно и тоже время суток.

Оценивали плодовитость самок вычислением индекса плодовитости

и индекса беременности. Определяли длительность беременности, численность потомства.

По истечении 30-ти сут после рождения часть крысят умерщвляли дислокацией шейных позвонков и проводили гистологическое исследование головного мозга и внутренних органов.

Цифровой материал подвергали статистической обработке. За единицу наблюдения принимали помет, т.е. результаты исследования одной самки.

Обработку статистического материала проводили методом вариационной статистики с определением t-критерия Стьюдента.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

Результаты воздействия амизона в изучаемых дозах на продолжительность эстрального цикла самок приведены в табл. 1 и свидетельствуют, что 15- дневное введение препарата во всех дозах не нарушало ритма эстрального цикла, средней его продолжительности. Стадии течки и межтечного периода достоверно не отличались от таковых в контроле. Эти данные свидетельствуют об отсутствии отрицательного влияния амизона на эстральный цикл экспериментальных животных.

При введении терапевтической дозы амизона (табл. 2) изменений в структурно — функциональных элементах яичника по сравнению с контролем не обнаружено, то есть препарат не влияет на репродуктивную функцию яичника. При введении максимальной (680 мг/кг) терапевтической дозы препарата наблюдалось достоверное увеличение количества структурно — функциональных элементов в железе, но репродуктивная функция яичника при этом не нарушалась.

Морфологическое исследования яичников показали, что при этом имеет место нормальный рост фолликула, выражающийся в увеличении объема пузырька за счет клеточных элементов и накопления жидкости, т.к. величина и структура фолликула являются критерием для определения степени его зрелости.

Во второй серии опытов по изучению эмбриотоксического и тератогенного действия препарата группы животных, подвергнутых в последующем лапаротомии, составили

17, 17 и 15 самок соответственно на каждую дозу. В контрольной группе было 16 животных.

Данные, полученные у беременных крыс, свидетельствуют, что изучаемые дозы амизона не влияют на прирост массы тела по сравнению с контролем в указанные сроки наблюдения. У животных, получавших препарат в терапевтической и максимальной дозе, по сравнению с контролем сроки беременности несколько удлинились, но не выходили за пределы физиологической нормы.

Как видно из табл.3, амизон не оказывал повреждающего действия на эмбрионы крыс. Пред- и постэмбриональная гибель зародышей после воздействия препарата не отличается от таковой у контрольных животных. Между массой плодов самок, получавших амизон, и контролем достоверных различий не установлено. После введения амизона в терапевтической и 5-ти кратной терапевтической дозе наблюдается уменьшение кранио-каудальных размеров, 10-ти кратной терапевтической дозе -изменения отсутствуют.

Из приведенных данных видно, что введение изучаемых доз амизона перед спариванием не приводило к увеличению пред- и постимпланта-

ционной гибели и к отставанию развития плодов.

Внешний осмотр плодов после вскрытия беременных самок во всех группах не выявил аномалий развития глаз, лицевого и мозгового черепа, конечностей, хвоста, передней брюшной стенки.

Исследование внутренних органов и тканей плодов на серийных последовательных срезах (предварительное введение амизона самкам в течение 15 -ти дней в изучаемых дозах) не выявило нарушений топографии и анатомии крупных сосудов (артерий и вен), сердца, легких, органов брюшной полости и малого таза. На уровне лицевого и мозгового черепа наблюдалась симметричность расположения анатомических структур нижней челюсти, переднего отдела твердого неба, носовой полости, глазных яблок и обонятельных лукович, больших полушарий головного мозга, мозжечка и продолговатого мозга.

На фронтальных срезах опытных и контрольных плодов установлена идентичность топографии гортани, пищевода, слюнных желез, трахеи, спинного мозга, крупных сосудов, сердца, легких, печени, желудка, всех отделов кишечника, поджелу-

дочной железы, почек, надпочечников, органов малого таза. Вместе с тем у отдельных плодов контрольных и опытных самок встречались небольшие гематомы различной локализации. Кроме того, у одного плода в контроле и у двух плодов опытных самок при воздействии амизона в дозе 340 мг/кг обнаружен левосторонний гидронефроз.

Аномалии развития скелета у плодов всех исследуемых групп животных отсутствуют.

Физическое развитие потомства в постнатальном периоде жизни по всем критериям соответствовало контролю. Отлипание ушных раковин, появление первичного шерстного покрова, прорезывание резцов, открытие глаз, открытие влагалища были такими же, как у интактных животных. И только у потомства самок, получавших амизон в дозе 340 мг/кг, несколько раньше прорезывались резцы (в контроле на $8,60 \pm 0,22$ день, а в опыте на $8,00 \pm 0,10$) и раньше открывались глаза (в контроле на $15,46 \pm 0,21$ день, в опыте на $14,90 \pm 0,16$).

Прирост массы тела и длины тела крысят в постнатальном периоде, родившихся от самок, которым в течение 3 — х эстральных циклов вводили амизон, указывает на отсут-

Таблица 1

Влияние амизона на эстральный цикл крыс при многократном (15 дней) внутрижелудочном введении ($M \pm m$)

Показатели	Контроль (интактные животные)	Амизон, мг/кг		
		68	340	680
Продолжительность эстрального цикла, дни	$4,75 \pm 0,020$	$4,80 \pm 0,031$	$4,79 \pm 0,030$	$4,74 \pm 0,020$
Продолжительность течки, дни	$1,30 \pm 0,011$	$1,30 \pm 0,011$	$1,32 \pm 0,040$	$1,42 \pm 0,020$
Продолжительность межтечкового периода, дни	$3,45 \pm 0,028$	$3,49 \pm 0,021$	$3,40 \pm 0,030$	$3,42 \pm 0,020$

Таблица 2

Влияние амизона на структурно-функциональные элементы яичников крыс ($M \pm m, n = 7$)

Группа животных		Премордиальные фолликулы	Фолликулы с 2-мя и более слоями гранулезных клеток	Граафовы пузырьки	Атретические тела	Желтые тела
Интактные		$330,00 \pm 24,00$	$91,43 \pm 5,94$	$5,00 \pm 0,65$	$57,80 \pm 4,20$	$7,42 \pm 0,52$
Амизон, мг/кг:	- 68	$361,90 \pm 19,30$	$92,10 \pm 12,53$	$6,14 \pm 0,59$	$53,14 \pm 4,11$	$7,57 \pm 0,57$
	- 340	$350,00 \pm 23,90$	$102,85 \pm 6,60$	$8,40 \pm 0,64^*$	$54,28 \pm 3,11$	$9,80 \pm 0,46^*$
	- 680	$407,14 \pm 23,33^*$	$135,17 \pm 10,50$	$9,70 \pm 1,49^*$	$48,28 \pm 8,05$	$9,57 \pm 0,36^*$

Примечание: в этой и последующих таблицах *- $P < 0,05$ по отношению к контролю

Влияние амизона на показатели эмбриогенеза у крыс

Группы животных	Количество живых плодов	Количество желтых тел	Количество мест имплантации	Гибель зародышей				Плоды		
				до имплантации		после имплантации		масса, г (M±m)	кранио — каудальные размеры, мм (M±m)	
				абс.	% (M±m)	абс.	% (M±m)			
Контроль n=18	148	179	163	16	8,61 ± 2,21	15	7,09 ± 1,99	2,74 ± 0,14	30,65 ± 0,49	
Амизон, мг/кг:	- 68; (n=17)	145	173	158	15	7,15 ± 2,59	13	8,05 ± 2,85	2,37 ± 0,12	28,90 ± 0,62 *
	- 340; (n=17)	150	181	162	19	8,62 ± 4,24	12	8,88 ± 2,81	2,61 ± 0,09	28,90 ± 0,62 *
	- 680; (n=15)	123	152	136	16	9,22 ± 4,68	13	8,81 ± 3,19	2,86 ± 0,25	31,35 ± 0,68

ствие отрицательного влияния препарата на физическое развитие потомства. И только у крысят, родившихся от самок, получавших амизон в 5-ти, 10-ти кратной терапевтической дозе, длина крысят при рождении несколько превышала таковую в контрольной группе. Однако в дальнейшем эти показатели соответствовали контрольным.

Уровень плодовитости и беременности крыс (табл. 4) свидетельствует об отсутствии токсического эффекта амизона на репродуктивную систему. У самок беременность заканчивалась родами. Численность потомства, масса тела и кранио — каудальные размеры крысят колебались в пределах физиологической нормы.

Многочисленное введение амизона в течение 15-ти дней не приводило к замедлению скорости созревания сенсорно-двигательных рефлексов в период вскармливания потомства (табл. 5).

Важное значение для характеристики эмбриотоксического действия лекарственного средства могут иметь данные о гибели крысят в начале

постнатального периода жизни. Как видно из табл. 6, в группах животных, получавших исследуемые дозы амизона в течение 15-ти дней — до наступления беременности, гибель крысят достоверно не отличалась от таковой в контроле (P>0,05). Видимых врожденных уродств у плодов не обнаружено.

На 30-е сут постнатального периода у крысят не выявлено внешних аномалий. Не обнаружено нарушений структуры головного мозга и внутренних органов, что согласуется с данными микроскопического исследования.

Ввиду того, что различий в морфологической картине головного мозга, внутренних органов и тканей опытных и контрольных животных не выявлено, результаты изложены в обобщенном виде.

На обзорных препаратах головного мозга (кора и подкорковые структуры на уровне хиазмы, мозжечок) не обнаружено гемодинамических нарушений. Цитоархитектоника и компактность изучаемых структур мозга не изменена. Определяется

послойное расположение нейронов в коре головного мозга. Дистрофических изменений в нейронах и глиальных элементах не отмечено.

Во внутренних органах: легкие, сердце, печень, почки, надпочечники, лимфоидные органы, желудок, кишечник, поджелудочная и щитовидная железа, а также в органах малого таза каких — либо структурных изменений не выявлялось. Отсутствовали изменения в паренхиме и строме исследуемых органов, не обнаружено циркуляторных нарушений.

Изучение эмоционально — двигательного поведения показало, что горизонтальная активность крысят, оцениваемая числом пересеченных ими квадратов, была достоверно выше при введении амизона в дозе 340 мг/кг, чем в группе контрольных животных (табл. 7,8). Эмоциональное состояние крысят в опыте было таким же, как и в контрольной группе.

Таким образом, амизон в изученных дозах не обладает эмбриотоксическим действием и не нарушает репродуктивной способности самок белых крыс.

Таблица 4

Индексы плодовитости и беременности самок крыс при внутрижелудочном введении амизона в течение 15 дней

Группа животных	Число спаренных самок	Число оплодотворенных самок	Число беременных самок	Индекс плодовитости	Индекс беременности	
Интактные	38	33	28	87	85	
Амизон, мг/кг:	-68	38	32	29	84	91
	-340	38	31	29	82	93
	-680	38	30	25	87	83

Данные о скорости созревания сенсорно-двигательных рефлексов
в период вскармливания крысят (сек, $M \pm m$)

Условия опыта		Перевоорачивание на плоскости	Отрицательный геотаксис	Избегание обрыва	Избегание обрыва, вызванное визуальным стимулом
Контроль (интактные животные)		4,7 ± 0,23	7,3 ± 0,20	9,23 ± 0,12	16,4 ± 0,29
Амизон, мг/кг:	- 68	4,3 ± 0,12	6,8 ± 0,20	9,33 ± 0,13	16,7 ± 0,33
	-340	4,5 ± 0,23	7,5 ± 0,13	9,50 ± 0,13	16,3 ± 0,28
	- 680	4,9 ± 0,22	7,4 ± 0,13	9,30 ± 0,13	16,4 ± 0,29

Таблица 6

Смертность крысят в течении 4-х недель постнатального развития

Группы животных		Количество родившихся крысят в группе	Среднее количество крысят в помете	Гибель за 1-ю неделю	Гибель за 2-ю неделю	Гибель за 3-ю неделю	Гибель за 4-ю неделю
Контроль (интактные животные)		128	11,15 ± 0,77	0,23 ± 0,12	0,96 ± 0,26	0,48 ± 0,13	0,23 ± 0,12
Амизон, мг/кг:	- 68	121	10,08 ± 0,58	0,42 ± 0,15	0,42 ± 0,15	0,50 ± 0,19	0,25 ± 0,13
	-340	135	10,38 ± 0,57	0,15 ± 0,15	0,53 ± 0,21	0,31 ± 0,17	0,23 ± 0,12
	- 680	108	10,45 ± 0,52	0,96 ± 0,30	0,40 ± 0,22	0,30 ± 0,15	0,40 ± 0,22

Таблица 7

Показатели эмоционально-двигательного поведения и способности к тонкой координации движений у крысят ($M \pm m$)

Условия опыта	Количество заглядываний в норку		Число пересеченных квадратов	
	1-й опыт	2-й опыт	1-й опыт	2-й опыт
Контроль	1,15 ± 0,56	0,85 ± 0,36	23,85 ± 5,25	45,85 ± 6,14
Амизон, 68 мг/кг	0,46 ± 0,27	1,31 ± 0,40	30,38 ± 4,61	37,46 ± 4,41
Амизон, 340 мг/кг	2,00 ± 0,71	1,92 ± 0,72	44,15 ± 5,73*	56,62 ± 6,42
Амизон, 680 мг/кг	0,92 ± 0,33	1,08 ± 0,52	22,80 ± 6,32	43,38 ± 9,60

Таблица 8

Показатели эмоционально-двигательного поведения и способности к тонкой координации движений у крыс ($M \pm m$)

Условия опыта	Число стоек (реакций оглядывания)		Число умываний (груминг)		Число актов дефекации и урикации	
	1-й опыт	2-й опыт	1-й опыт	2-й опыт	1-й опыт	2-й опыт
Контроль	2,85 ± 0,70	6,0 ± 0,94	17,05 ± 6,08	9,81 ± 4,68	3,31 ± 0,79	1,23 ± 0,54
Амизон, 68 мг/кг	5,69 ± 0,85*	5,0 ± 0,54	15,7 ± 3,78	12,84 ± 2,77	1,69 ± 0,43	1,31 ± 0,71
Амизон, 340 мг/кг	6,38 ± 1,02 **	8,0 ± 1,07	8,42 ± 2,26	6,35 ± 2,0	1,92 ± 0,51	0,62 ± 0,37
Амизон, 680 мг/кг	3,85 ± 1,20	6,62 ± 1,33	23,39 ± 4,77	43,38 ± 9,60**	1,69 ± 0,65	0,54 ± 0,22

Примечания: * — $P < 0,05$ (по отношению к контролю);

** — $P < 0,01$ (по отношению к контролю).