

ФАРМАКОЛОГИЯ РЕПРОДУКТИВНОЙ СИСТЕМЫ

ВЛИЯНИЕ БЕМИТИЛА НА РАЗВИТИЕ КРЫСЯТ В ОНТОГЕНЕЗЕ

А. А. Спасов, Л. И. Бугаева, Т. Д. Денисова, Л. А. Смирнова¹

Экспериментально установлена неоднородность физического и полового развития потомства крысят, матерям которых в период лактации в желудок вводили бемитил в дозах 20 и 100 мг/кг. При этом фармакокинетическими исследованиями подтверждено проникновение препарата с молоком матери в организм молочных крысят. В профиле ранних эффектов бемитила выявлялось стимулирующее влияние на мышечную силу и сенсорно-двигательные рефлексы крысят. В профиле отдаленных эффектов бемитила обращает на себя внимание влияние на процессы полового созревания.

Ключевые слова: бемитил, актопротекторы, фармакокинетика, лактационный барьер, постнатальное развитие, половое поведение

ВВЕДЕНИЕ

Производное бензимидазола — препарат бемитил на протяжении ряда лет используется в клинической практике в качестве психотропного средства с актопротекторным типом действия [10]. Вместе с тем специфические свойства препарата исследованы не в полной мере. Известно [1, 3], что препарат хорошо проникает через гематоэнцефалический барьер и быстро накапливается в мозговой ткани в концентрациях, значительно (в 3–8 раз) превышающих плазменные. В последние годы появились данные, свидетельствующие о вмешательстве бемитила в процессы гипоталамо-гипофизарной регуляции выработки гонадотропных гормонов. При этом в экспериментах на крысах выявлено влияние препарата (стимулирующее — в дозе 20 мг/кг, угнетающее — в дозе 200 мг/кг) на спермато- и овогенез, спариваемость, процессы зачатия и постнатальное развитие потомства [4, 6, 8, 9, 14, 16]. В исследованиях на женщинах репродуктивного возраста с нейроэндокринными нарушениями показано, что под действием бемитила происходит увеличение секреции гонадотропных и яичниковых гормонов [15]. Учитывая представленные сведения, сочли целесообразным изучить процессы физического формирования крысят при введении бемитила лактирующим крысам-матерям.

Целью настоящей работы явилось исследование особенностей постнатального развития крысят, матерям которых в период молочного вскармливания потомства в желудок вводили бемитил.

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Эксперименты проведены на 36 пометах крысят (общее количество крысят составило 288 особей), по-

лученных от спаривания интактных лабораторных белых крыс самок с самцами, с исходной массой 180–220 г. Экспериментальных животных содержали в изолированном от внешних воздействий блоке вивария НИИ фармакологии. Пищевой рацион, освещение вивария и правила спаривания животных были стандартными и отвечали нормативным требованиям [11].

Из подопытных животных (крысы-матери и пометы крысят) формировали три равные (по 12 пометов) экспериментальные группы. Первая группа — контрольная — была интактной. Лактирующим крысам-матерям второй и третьей групп с 3-го по 15-й дни молочного вскармливания потомства вводили в желудок (металлическим зондом) бемитил в дозах 20 и 100 мг/кг соответственно. В экспериментах исследовали возможность проникновения препарата с молоком матери в организм молочных крысят и влияния его на их развитие в инфантильный и ювенильный периоды.

Оценку влияния бемитила на развитие крысят в онтогенезе проводили с учетом рекомендаций И. В. Саноцкого и Н. М. Смольниковой [12, 13]. При этом о раннем влиянии бемитила на развитие инфантильных крысят, находящихся на молочном вскармливании, судили по параметрам прироста массы тела, появления шерстного покрова, отлипания ушной раковины, прорезывания резцов, открытия глаз, поведения, скорости формирования сенсорно-двигательных рефлексов, мышечной силы. Скорость формирования сенсорно-двигательных рефлексов и координаторную способность оценивали в тестах — “отрицательный геотаксис”, “избегание обрыва”, ползания на поверхности, подъема головы и тела, опоры на конечности. В отдаленные периоды (после отмены бемитила) наблюдений у крысят оценивали общее состояние, измеряли динамику прироста массы тела. Кроме того, исследовали способность крысят к “ориентации в пространстве и в воздухе”, следили за сроками опущения яичек в мо-

¹ НИИ фармакологии Волгоградского медицинского университета, Волгоград, 400066, пл. Павших борцов, 1а.

шонку у самцов, открытия вагины у самок и у них же, в 3-месячном возрасте, исследовали эстральную цикличность.

О проникновении бемитила в молоко матери судили по результатам измерений его содержания в молочных железах лактирующих самок. Данные исследования выполнены на 20 лактирующих крысах и их пометах крысят. Бемитил в дозе 20 мг/кг вводили в желудок (металлическим зондом) лактирующим крысам-самкам с 3-го по 16-й день молочного вскармливания потомства. В день взятия проб крови и молочных желез кормящих крыс-самок декапитировали через 0,5; 1; 1,5; 2; 3 и 6 ч после введения препарата. Кровь и 20 % гомогенаты молочных желез центрифугировали 10 мин при 3000 об/мин. В другой серии экспериментов исследовали возможность проникновения с молоком матери бемитила в организм трехдневных крысят. С этой целью через 2 ч после внутривентрикулярного введения бемитила в дозе 20 мг/кг лактирующим крысам-матерям, ее потомство — трехдневных крысят — декапитировали. У крысят забирали содержимое желудка, из которого готовили гомогенат и центрифугировали 10 мин при 3000 об/мин. Бемитил экстрагировали из плазмы крови (антикоагулянт — цитрат натрия) и надосадочных жидкостей гомогенатов при добавлении равного количества ацетонитрила. Для полного осаждения белков пробы отстаивали 20 мин, затем центрифугировали 10 мин при 3000 об/мин.

Количественное определение бемитила проводили методом ВЭЖХ на хроматографе Hewlett Packard серии 1050 с УФ-детектором при длине волны 280 нм в колонке Separon SGX C18 при элюировании смесью, содержащей в равных количествах ацетонитрил (УФ-210) и ацетатный буфер (рН 3,6). Время удерживания 7 мин. Чувствительность метода 10 нг/мл.

Тканевую биодоступность оценивали по отношению площадей фармакокинетических кривых (AUC) в крови и молочных железах крыс и по коэффициенту распределения, рассчитанному как соотношение максимальных концентраций в крови и ткани.

Статистическую обработку результатов проводили в программе Microsoft Excel. О достоверности результатов судили по *t*-критерию Стьюдента.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

По результатам наблюдений за состоянием и поведением крыс самок в периоды беременности и молочного вскармливания потомства значимых межгрупповых различий не обнаружено. Вместе с тем при измерении массы тела у лактирующих крыс, получавших бемитил в дозах 20 и 100 мг/кг (вторая и третья группы), выявлена тенденция ее меньшего прироста соответственно на 20 и 40 %.

По результатам измерения массы тела у потомства-крысят, находящихся на молочном вскармливании у крыс-матерей, которым вводили бемитил (табл. 1), вы-

явлена положительная динамика. Однако темпы прироста массы по группам были различными. Так, масса тела у двухнедельных крысят во второй группе (бемитил вводили крысам-матерям в дозе 20 мг/кг) оказалась ниже в среднем на 16 %, чем в первой — интактной группе. Вместе с тем у двухнедельного потомства-крысят третьей группы (бемитил вводили крысам-матерям в дозе 100 мг/кг) — прирост массы тела опережал контрольные значения в среднем на 21 % ($p < 0,05$). Подобные различия в приросте массы тела у исследуемых крысят фиксировали и в трехнедельном возрасте, т.е. уже после отмены бемитила крысам-матерям.

Таким образом, из полученных экспериментальных данных следует, что бемитил при введении лактирующим крысам-матерям влияет на прирост массы тела кормящих крыс и вскармливаемого ею потомства. Подобные эффекты у бемитила были выявлены в более ранних исследованиях на крысятах, матерям которых препарат вводили до спаривания с интактными самцами [6, 14]. Можно предположить, что выявленные сдвиги у крысят, матерям которых бемитил вводили как до спаривания, так и в период молочного вскармливания опосредованы специфической активностью препарата. Не исключено, что в силу липоидотропности бемитил проникает и накапливается в молочных железах, затем попадает в организм молочных крысят. Вследствие способности у бемитила центрального вмешательства в секрецию гипоталамо-гипофизарных гормонов [15] можно также предположить влияние препарата на секрецию пролактина и соответственно — на качество молока. Данное предположение подтверждается и результатами наблюдений за физическим развитием потомства. У тестируемых крысят выявлялись межгрупповые различия в сроках появления шерстного покрова, прорезывания резцов, открытия глаз, подъема туловища (табл. 2 и 3). Формирование обозначенных параметров у крысят в третьей группе (лактирующие самки получали бемитил в дозе 100 мг/кг) достоверно запаздывало относительно контроля, тогда как у крысят во второй группе (лактирующие самки получали бемитил в дозе 20 мг/кг) ускоря-

Таблица 1. Динамика массы тела (в г) инфантильных крысят, находящихся на молочном вскармливании у самок, получавших (в желудок, 2 недели) бемитил

Варианты опытов	Дни измерений		
	8-й	14-й	21-й
Контроль	12,4 ± 0,90	19,0 ± 0,78	26,9 ± 0,90
Бемитил, 20 мг/кг	11,1 ± 0,55	15,9 ± 0,85 (– 16)	22,6 ± 1,60 (– 15)
Бемитил, 100 мг/кг	14,1 ± 0,45*	23,1 ± 0,35* (+ 21)	29,7 ± 0,45 (+ 13)

Примечание. Здесь и в табл. 2, 3, 5: * — результаты достоверны по отношению к контролю при $p < 0,05$; минус — прирост массы тела в % относительно контрольной группы.

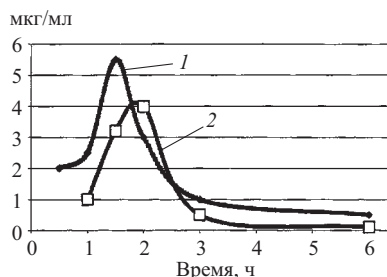


Рис. 1. Содержание бемитила в крови (1) и молочных железах (2) лактирующих крыс.

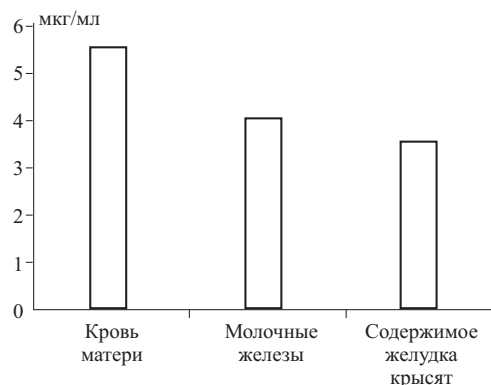


Рис. 2. Содержание бемитила в желудке молочных крысят, а также в крови и молочных железах кормящих крыс-матерей через 2 ч после введения препарата матерям.

лись сроки появления шерстного покрова. Кроме того, у данных крысят относительно контроля достоверно увеличивалась скорость формирования сенсорно-двигательных рефлексов (по тестам “отрицательный геотаксис”, “избегание обрыва”). При этом у крысят во 2-ой группе время выполнения “отрицательного геотаксиса” достоверно сокращалось в среднем на 33 %, не существенно (10 %) повышалась мышечная сила (табл. 3). У крысят в третьей группе время выполнения теста “отрицательный геотаксис” и “избегание обрыва” сокращалось относительно контроля соответственно на 22 % ($p < 0,05$) и 8 % ($p > 0,05$), а мышечная сила возрастала в среднем на 13 % ($p > 0,05$). Остальные параметры физического развития у инфантильных крысят подопытной группы были сопоставимы с контрольными животными.

Учитывая полученные данные и сведения литературы [1, 3, 7, 14, 16], в последующем исследовали возможность проникновения бемитила с молоком матери в организм молочных крысят. С этой целью бемитил в дозе 20 мг/кг вводили в желудок (металлическим зондом) лактирующей крысе. В первой серии экспериментов после введения препарата определяли его на-

личие в молочных железах и крови самки (частота взятия проб указана в методах). В другой серии исследований определяли наличие бемитила в содержимом желудка у вскармливаемого ею крысенка (рис. 1 и 2).

По результатам первой серии исследований выявлено наличие максимальных концентраций бемитила в крови и молочных железах крыс-матерей через 2 ч. При этом к третьему часу исследований концентрация бемитила у кормящих самок понижалась. Коэффициент тканевой биодоступности и распределения препарата составил соответственно 0,6 и 0,73 условных единиц.

По результатам второй серии исследований бемитил в довольно высоких концентрациях (63 % от его уровня в крови крысы-матери) обнаруживался в содержимом желудка крысят через 2 ч после его введения лактирующим крысам-матерям. При этом коэффициент распределения препарата у крысят, по отношению к крови матери составил 0,63 единицы (см. рис. 2).

Таким образом, из проведенных исследований следует, что сдвиги отдельных параметров в физическом

Таблица 2. Физическое развитие (в днях) потомства крысят, матери которых получали (в желудок, две недели в период лактации) бемитил

Параметры	Варианты опытов		
	Контроль	Бемитил	
		20 мг/кг	100 мг/кг
Отлипание ушной раковины	2,1 ± 0,02	2,1 ± 0,03	2,2 ± 0,02
Появление волосяного покрова	4,9 ± 0,02	4,6 ± 0,01*	5,5 ± 0,02*
Прорезывание резцов	8,8 ± 0,06	9,8 ± 0,03*	10,2 ± 0,01*
Открытие глаз	15,2 ± 0,02	15,7 ± 0,02*	16,1 ± 0,02*
Подъем головы	8,0 ± 0,02	8,0 ± 0,04	8,6 ± 0,01*
Ползание	8,9 ± 0,03	9,2 ± 0,01	9,4 ± 0,02*
Подъем тела	10,0 ± 0,02	10,0 ± 0,01	10,7 ± 0,02*
Открытие вагины	30,7 ± 0,10	32,0 ± 0,10*	27,6 ± 0,10*
Опускание яичек в мошонку	25,7 ± 0,10	27,0 ± 0,10*	22,9 ± 0,10*

Таблица 3. Сенсорно-двигательные рефлексы (в с) инфантильных крысят, матери которых получали (в желудок, 2 недели) бемитил

Исследуемые параметры	Варианты опытов		
	Контроль	Бемитил	
		20 мг/кг	100 мг/кг
Отрицательный геотаксис	8,6 ± 0,39	5,7 ± 0,10*	6,7 ± 0,18
Переворачивание на плоскости	1,0 ± 0,01	1,0 ± 0,02	1,0 ± 0,01
“Избегание обрыва”	9,4 ± 0,50	11,2 ± 0,12*	8,7 ± 0,17
Переворачивание в воздухе	0,9 ± 0,01	0,9 ± 0,02	0,9 ± 0,01
Мышечная сила	9,4 ± 0,55	10,4 ± 0,10	10,6 ± 0,50

развитии у крысят, матерям которых в период лактации вводили бемитил, обусловлены проникновением определенной дозы препарата, в организм крысенка с молоком матери. В связи с этим эффекты системного действия препарата [1, 3, 15], его способность проникать через гематоэнцефалический барьер, накапливаться в мозговой ткани [1] и вмешиваться в процессы полового созревания [4] экстраполированы и на развивающиеся особи. Можно также предположить, что вмешательство бемитила в центральные холинергические механизмы, в свою очередь контролируемые выработку гипоталамо-гипофизарных гормонов [5], повлияло и на секрецию гормона лактогенеза-пролактина. Изменение его секреции отразилось в раннем периоде на физическом развитии потомства, а в более позднем — на формировании полового развития. Высказанные предположения послужили предпосылкой для продолжения проведения наблюдений за развитием крысят после перехода на дифинитивное питание. Результаты наблюдений отражены в табл. 2 и 5. Из представленных в таблицах данных видно, что изменения в приросте массы тела, выявленные у молочных крысят, проявлялись и в последующем у ювенильных крысят (табл. 5). При этом в сравнении с контрольной группой (первая группа интактных крысят) у крысят второй и третьей групп (бемитил в дозах 20 и 100 мг/кг, вводимый лактирующим крысам-матерям) фиксировалась достоверная динамика большего прироста на первый и второй месяцы наблюдений. На третий месяц наблюдений темпы прироста массы тела у крысят второй группы были более высокими, тогда как у крысят третьей группы стали спадать. По окончании эксперимента суммарный прирост массы тела в третьей группе оказался на уровне контрольных значений. Достоверными оказались и межгрупповые различия в сроках полового созревания крысят. При этом у крысят во второй группе запаздывали в среднем на 2 дня сроки открытия вагины у самок и опущения яичек в мошонку у самцов. У третьей группы крысят сроки открытия вагины у самок и опущения яичек в мошонку у самцов, наоборот, опережали контрольные значения в среднем на 2 дня. Межгрупповые различия в сроках полового созревания у ювенильных самок от-

разились и на их эстральной цикличности. У этих животных зафиксирована тенденция (20 %) удлинения фазы метаэструса и диэструса, но сокращения фазы проэструса и эструса. Подобные результаты влияния бемитила на эстральную цикличность были зафиксированы и у взрослых особей [8, 9].

Таким образом, проведенные исследования позволяют сделать заключение, что бемитил, вводимый (в желудок, две недели) крысам-матерям в период молочного вскармливания потомства, попадает с молоком в организм крысят. Ориентируясь на полученные нами данные по физическому и половому созреванию крысят, матери которых в период лактации (2 недели) получали бемитил в дозе 20 и 100 мг/кг, можно предположить, что фармакодинамическое действие препарата связано с концентрацией препарата, поступившего с молоком матери в организм вскармливаемого крысенка. При этом фармакокинетические свойства препарата, обуславливающие процессы его всасывания, распределения, кумуляции (преимущественно в мозговой ткани) [1, 5] и механизмы его центрального вмешательства в секрецию гонадотропных гормонов [7, 15] и пролактина кормящей матери нашли свое отражение в физическом развитии потомства. У крысят повышалась прибавка массы тела, ускорялись процессы формирования сенсорно-двигательных рефлексов и мышечной силы. Возможно, указанные механизмы вмешательства бемитила в выработку репродуктивных гормонов крыс-матерей и их потомства сказались и в отдаленные сроки, т.е. после перехода крысят на дефинитивное питание и, соответственно, прекращения попадания препарата в их организм. При этом темпы прироста массы тела у крысят оставались выше контрольных значений. А сроки полового созревания (открытие вагины у самок и опущения яичек в мошонку) запаздывали в группах крысят, матерям которых бемитил вводили в дозе 20 мг/кг и, наоборот, интенсифицировались у крысят, матери которых получали препарат в дозе 100 мг/кг.

ВЫВОДЫ

1. Бемитил, вводимый крысам-матерям в период молочного вскармливания потомства, проникает с мо-

Таблица 4. Фармакокинетические параметры бемитила у лактирующих крыс-самок

Параметры	В крови	В молочных железах
AUC , мкг/мл/ч	10,94	6,61
Cl , л/ч/кг	1,83	—
V_d , л	3,43	—
$T_{1/2}$, ч	1,30	—
MRT , ч	2,45	—
C_{max} , мкг/мл	5,5	4,0
T_{max} , ч	1,5	2,0
F	—	0,604
K_d	—	0,73

Таблица 5. Динамика массы тела (в г) ювенильных крысят, матери которых получали (в желудок, две недели) бемитил

Варианты опытов	Периоды измерений		
	1 мес	2 мес	3 мес
Контроль	33,7 ± 1,23	57,2 ± 2,25 (70)	84,2 ± 2,43 (150)
Бемитил, 20 мг/кг	30,8 ± 1,85	56,5 ± 3,05 (83)*	91,1 ± 7,55 (196)*
Бемитил, 100 мг/кг	38,8 ± 0,65*	73,8 ± 1,30* (90)*	98,6 ± 1,50* (154)

Примечание. В скобках — прирост массы тела крысят в % относительно но 1 мес измерений.

локом матери в организм молочных крысят, оказывает ранний и отдаленный эффекты на их развитие.

2. У инфантильных крысят, находящихся на вскармливании у крыс-самок, получавших бемитил в дозах 20 и 100 мг/кг, запаздывали сроки прорезывания резцов, открытия глаз и ускорялись сенсорно двигательные рефлексы.

3. Сроки полового созревания у ювенильных крысят, матери которых получали в период лактации бемитил в дозе 20 мг/кг, запаздывали, тогда как у крысят, матери которых получали препарат в дозе 100 мг/кг, — сокращались.

ЛИТЕРАТУРА

1. Ю. Г. Бобков, И. С. Морозов, А. И. Мачула, *Пат. физиол.*, № 2, 39 – 41 (1990).
2. Т. Г. Боровая, О. В. Волкова, *Бюл. exper. биол.*, № 9, 326 – 328 (1994).
3. С. С. Бойко, Ю. Г. Бобков, Т. А. Доброхотова и др., *Фармакол. и токсикол.*, № 3, 79 – 81 (1987).
4. Л. И. Бугаева, А. А. Спасов, Е. А. Кузубова, Е. В. Кожевникова, *Всероссийская научная конференция от Materia Medica к современным медицинским технологиям*, С.-Петербург, (1998), сс. 29 – 30.
5. Л. И. Бугаева, *Автореф. дис. докт. биол. наук*, Волгоград (2001).
6. И. Н. Иежица, *Автореф. дис. канд. биол. наук*, Волгоград (1998).
7. А. Коуи, *Гормональная регуляция размножения у млекопитающих*, Мир, Москва (1987).
8. Е. А. Кузубова, Л. И. Бугаева, Е. В. Кожевникова, *Материалы 55 региональной конференции по фармации, фармакологии и подготовке кадров*, Пятигорск (2000).
9. Е. А. Кузубова, *Автореф. дис. кандидата биол. наук*, Волгоград (2001).
10. М. Д. Машковский, *Лекарственные средства*, 13-е изд., Т. 1 – 2, Торсинг, Харьков (1997).
11. *Руководство по экспериментальному (доклиническому) изучению новых фармакологических веществ*, Москва (2000).
12. И. В. Саноцкий, В. Н. Фоменко, Л. С. Сальникова и др., *Методические указания НИИ гигиены труда и профзаболеваний*, РАМН (1978).
13. Н. М. Смольникова, *Фармакол. и токсикол.*, № 1, 100 – 104 (1982).
14. А. А. Спасов, И. Н. Иежица, Л. И. Бугаева, *Материалы 55 региональной конференции по фармации, фармакологии и подготовке кадров*, Пятигорск (2000), сс. 166 – 167.
15. Л. В. Ткаченко, *Сб. науч. трудов ВМА*, Волгоград, **52**(3), 66 – 67(1997).
16. А. А. Spasov, L. I. Bugaeva, I. N. Yozhitsa (eds.), *Abstracts of XIVth International simposium on medical chemistry*, (1996).

Поступила 31.05.04

THE EFFECT OF BEMITHYL ON THE ONTHOGENESIS OF RATS

A. A. Spasov, L. I. Bugaeva, T. D. Denisova, and L. A. Smirnova

Institute of Pharmacology, Volgograd State Medical Academy, pl. Pavshikh Bortsov 1a, Volgograd, 400066 Russia

Female rats were treated with bemithyl (20 and 100 mg/kg) via a gastric tube during a 16-day period of lactation. It was found that the drug is transferred with breast milk to the organism of newborns, which leads to nonuniformities in their development. Among the early effects of bemithyl, most pronounced is the stimulating action upon maturation (muscle strength) and the development of sensor-locomotor reflexes; in the spectrum of long-term effects, the drug influence upon pubescence processes was manifested.