

ТОКСИКОЛОГИЯ ЛЕКАРСТВЕННЫХ СРЕДСТВ

ДОКЛИНИЧЕСКОЕ ИЗУЧЕНИЕ ТОКСИЧНОСТИ НООПЕПТА

Л. П. Коваленко, Н. М. Смольникова, С. В. Алексеева, Е. П. Немова, А. В. Сорокина,
М. Г. Мирамедова, С. П. Курапова, Е. И. Сидорина, А. В. Кулакова, Н. О. Даугель-Дауге¹

Проведено доклиническое исследование безопасности нового ноотропного препарата ноопепта (этиловый эфир N-фенил-ацетил-L-пропил-глицина). Ноопепт в дозах 10 и 100 мг/кг вводили внутрь самцам и самкам крыс и кроликов в течение 6 мес. Результаты проведенных наблюдений свидетельствуют, что ноопепт в диапазоне исследованных доз не вызывает необратимых патологических изменений в обследованных органах и системах животных, не обладает аллергенной, иммунотоксической и мутагенной активностью, не влияет на генеративную функцию, антенатальное и постнатальное развитие потомства. Ноопепт дозозависимо подавляет реакцию воспаления, развивающуюся в ответ на введение конканавалина А, стимулирует клеточный и гуморальный иммунный ответ у мышей.

Ключевые слова: ноопепт, токсичность, аллергенность, иммунотоксичность, тератогенность, мутагенность, лабораторные животные

ВВЕДЕНИЕ

В НИИ фармакологии РАМН создан новый фармакологический препарат ноопепт (ГВС-111), обладающий ноотропной активностью.

Экспериментальные исследования, проведенные в сравнении с пирацетамом, показали, что ноопепт проявляет активность в более широком диапазоне доз и превосходит препарат сравнения по спектру положительных мнестических эффектов. Наряду с ноотропным ноопепт обладает выраженным нейропротекторным свойством и может быть перспективен для лечения заболеваний нервной системы, сопровождающихся снижением интеллектуально-мнестических функций [1, 5].

Целью настоящей работы явилось исследование общей и специфической токсичности ноопепта у экспериментальных животных.

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Ноопепт (этиловый эфир N-фенил-ацетил-L-пропил-глицина) синтезирован в НИИ фармакологии РАМН.

Экспериментальных животных (мыши, крысы, морские свинки и кролики) содержали в стандартных условиях вивария НИИ фармакологии РАМН, отвечающих действующим Санитарным правилам, со свободным доступом к воде и сбалансированному брикетированному комбикорму с добавкой творога и моркови.

Во всех вариантах эксперимента животным контрольных групп вводили через зонд в желудок дистиллированную воду в объеме, равном количеству раствора ноопепта, используемому в эксперименте.

Опыты по изучению хронической токсичности ноопепта проведены на двух видах животных обоего пола: 48 белых бес-

породных крысах и 22 кроликах породы шиншилла. Препарат вводили на протяжении шести месяцев внутрь ежедневно однократно крысам в дозах 10 мг/кг (ED₅₀) и 100 мг/кг (10ED₅₀), кроликам из расчета 10 мг/кг. При этом часть крыс, получавших ноопепт в дозе 100 мг/кг препарата, была обследована спустя месяц после окончания курсового введения (“отставленный” опыт). Обследование животных всех контрольных и экспериментальных групп проведено в соответствии со стандартным протоколом, рекомендованным МЗ РФ [3].

Аллергизирующие свойства ноопепта (10 и 100 мг/кг) исследовали путем оценки его анафилактогенной (общая анафилаксия, активная кожная анафилаксия) активности и реакции гиперчувствительности замедленного типа на морских свинках альбиносах, кроме того, оценивали его влияние на реакцию воспаления, индуцированную конканавалином А у мышей линии СВА[3].

Иммунотоксичность ноопепта (внутри в течение 14 дней в дозах 10 и 100 мг/кг) определяли в экспериментах, проведенных на мышах F1 (СВА · С57BL/6), СВА и С57BL/6. На гибридных животных оценивали влияние препарата на массу и клеточность органов иммунной системы, активность хемилуминесцентного ответа нейтрофилов крови на опсонизированный зимозан и форболмиристагетат, а также реакцию гиперчувствительности замедленного типа. На инбредных животных, оппозитно реагирующих на эритроциты барана, определяли число антителообразующих клеток[3].

Опыты по изучению репродуктивной токсичности ноопепта проведены на белых беспородных крысах. При оценке влияния на антенатальное развитие плода препарат вводили внутри с 1-го по 19-й день беременности в дозах 1, 20 и 100 мг/кг. При исследовании влияния на постнатальное развитие потомства препарат вводили в течение всей беременности в дозе 20 мг/кг. Наблюдение за крысятами осуществляли до 60-го дня жизни. Наблюдения за влиянием ноопепта на генеративную функцию осуществляли при 15-дневном (3 эстральных цикла) введении препарата в дозах 20 и 100 мг/кг самкам и при 60-дневном (период сперматогенеза) введении в дозах 10 и 100 мг/кг самцам крыс[3].

Мутагенность ноопепта исследовали методами учета соматического мозаицизма у дрозофилы, доминантных летальных мутаций и хромосомных aberrаций в клетках костного мозга у мышей F1(СВА · С57BL/6) и С57BL/6 соответственно. В экспериментах на мышах препарат вводили однократно внутри-

¹ Лаборатория лекарственной токсикологии (руководитель — проф. А. Д. Дурнев) НИИ фармакологии РАМН, 125315, Москва, ул. Балтийская, 8.

брюшинно в дозе 50 мг/кг и на протяжении 5 дней из расчета 0,5 мг/кг. В экспериментах на дрозофиле ноопепт использовали в концентрации 10 мг/мл кормовой среды.

Во всех вариантах экспериментов эвтаназия кроликов и крыс проведена способом декапитации, что соответствует существующим методическим рекомендациям [2].

Полученные данные обработаны статистически с привлечением ранее рекомендованных стандартных методов [3] с помощью программы "Statistica-5.0" Windows '95.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

При изучении хронической токсичности ноопепта не выявлено его существенного влияния на внешний вид, динамику массы тела и поведение животных.

В тесте "открытое поле" наблюдали увеличение вертикальной двигательной активности у самок и самцов крыс, получавших ноопепт в дозе 10 мг/кг, и у самок крыс, при использовании препарата в дозе 100 мг/кг. У самцов, получавших препарат в дозе 100 мг/кг, отмечено угнетение горизонтальной двигательной и исследовательской активностей. Выявленные поведенческие эффекты с большой долей вероятности обусловлены специфической фармакологической активностью ноопепта.

Электрокардиографическое исследование крыс, проведенное через 3 и через 6 мес от начала введения ноопепта (10 и 100 мг/кг), не выявило каких-либо свидетельств негативного воздействия препарата на сердечную деятельность.

Изучение периферической крови крыс показало, что 6-месячное введение ноопепта в дозе 100 мг/кг приводит к увеличению количества гемоглобина у самцов и самок, на 15,6 и 28% соответственно. Однако величина наблюдаемых показателей не выходила за верхнюю границу нормы [4]. Аналогичную ситуацию наблюдали при определении числа лейкоцитов, которое в пределах референтных показателей оказалось сниженным у самцов и самок на 13 и 36% соответственно. Также в пределах референтных показателей у крыс обоего пола основной и "отставленной" групп было снижено количество лимфоцитов в лейкограмме в среднем на 23,5% за счет увеличения сегментоядерных нейтрофилов.

Биохимические исследования выявили снижение содержания мочевины и креатинина в сыворотке крови крыс после 6-месячного введения ноопепта в дозах 10 и 100 мг/кг. Кроме того, препарат в дозе 100 мг/кг вызывал снижение активности аланин- и аспартат-аминотрансферазы.

В противовес этому в крови кроликов через 3 мес введения ноопепта в дозе 10 мг/кг отмечено повышение активности аланин- и аспартат-аминотрансфераз и возрастание концентрации мочевины. Через 6 мес введения эти показатели снижались до уровня контроля. В то же время в этот срок наблюдений у самцов и самок отмечено достоверное увеличение содержания креатинина.

Биохимические исследования мочи крыс выявили увеличение содержания белка и мочевины в группах животных, получавших ноопепт в дозе 100 мг/кг.

Вышеописанные биохимические показатели мочи и крови характеризуются противоречивостью, но в целом свидетельствуют о том, что 6-месячное ежедневное введение ноопепта может приводить к нарушению состояния печени и почек, что нашло частичное подтверждение в патоморфологическом исследовании.

Патологоанатомическое и гистологическое исследование пищевода, желудка, тонкого и толстого отделов кишечника крыс и кроликов не выявило местнораздражающего действия ноопепта.

Макроскопическое и микроскопическое обследование внутренних органов крыс и кроликов всех экспериментальных групп не выявило патологических изменений. Только у крыс, получавших ноопепт в дозе 100 мг/кг, обнаружена диффузная начальная белковая и очаговая вакуолярная дистрофия печени и почек, сочетающаяся с полиморфными изменениями ядер гепатоцитов и нефроцитов в виде гипо- и гиперхромии и полиплоидизации, а также дистрофические изменения в виде начальной белковой (зернистой) дистрофии миокардиоцитов. У животных "отставленной" группы эти изменения значительно менее выраженными, что говорит об их обратимости.

В экспериментах на морских свинках-альбиносах не выявлено образования кожносенсебилизирующих антител и анафилактической активности ноопепта в дозах 10 и 100 мг/кг. Реакция гиперчувствительности замедленного типа отсутствовала у 9 обследованных морских свинок, иммунизированных ноопептом в дозе 10 мг/кг, и была слабо выражена у двух из девяти обследованных животных, иммунизированных препаратом в дозе 50 мг/кг.

Ноопепт дозозависимо подавлял развитие реакции воспаления на введение мышам конканавалина А. Однократное введение препарата в дозе 10 мг/кг снижало индекс реакции с $25,3 \pm 6,5$ до $13,1 \pm 4,8$, а в дозе 100 мг/кг до $8,4 \pm 3,7$.

Введение ноопепта в дозах 10 и 100 мг/кг в течение 14 дней приводило к статистически значимому увеличению массы тимуса и селезенки у мышей.

Аналогичная обработка мышей не изменяла параметров хемилюминесцентного ответа нейтрофилов на форболмиристагетат и опсонизированный зимозан.

Ноопепт, вводимый мышам в течение 14 дней в дозах 10 и 100 мг/кг, не оказывал токсического действия на гуморальный и клеточный иммунный ответ. Более того, в дозе 10 мг/кг препарат увеличивал антителообразование у мышей линии C57BL/6 и в дозах 10 и 100 мг/кг достоверно стимулировал реакцию гиперчувствительности замедленного типа.

Описанные выше результаты иммунологических наблюдений позволяют предполагать, что ноопепт на-

ряду с ноотропными свойствами обладает иммуностимулирующей и противовоспалительной активностью.

В ходе исследований репродуктивной токсичности ноопепта в первую очередь оценивали его влияния на антенатальное развитие плода. Введение ноопепта в дозах 1, 20 и 100 мг/кг 36 самкам с 1-й по 19-й день беременности не сказывалось на общем состоянии, динамике массы тела и поведении крыс. Анализ эмбрионального материала в опытной группе в сравнении с контролем не выявил существенных различий в пред- и постимплантационной гибели эмбрионов, в массе и кранио-каудальном размере плодов. Не отмечено различий в уровне аномалий развития внутренних органов, включая дефекты скелета.

Наблюдения за динамикой массы тела потомства обоих полов, полученного от 36 крыс, ежедневно получавших ноопепт в дозе 20 мг/кг на протяжении всего срока беременности, а также оценка их физического развития, становления у них двигательной активности, формирования сенсорно-двигательных рефлексов, адаптивного поведения и поведения в "открытом поле", проведенная в период до 60-го дня жизни, не выявила различий в показателях, регистрируемых в контрольной и опытной группах.

Ноопепт, в дозах 20 и 100 мг/кг крыс, не оказывал влияния на генеративную функцию самцов и самок.

Оценка влияния ноопепта на уровень соматического мозаицизма у дрозофилы, регистрируемого по маркерам *yellow* и *singet*, не выявила способности препарата индуцировать генные мутации. Однократное внутрибрюшинное введение препарата в дозе 50 мг/кг не влияло на продукцию доминантных летальных мутаций на постмейотических стадиях сперматогенеза и уровень хромосомных повреждений в клетках костного мозга мышей. Пятидневное внутрибрюшинное инъецирование ноопепта в дозе 0,5 мг/кг также не оказало воздействия на спонтанный уровень мутирования в костном мозге мышей.

Совокупность результатов, полученных при проведении комплексного доклинического исследования безопасности применения ноопепта, указывает на отсутствие у препарата выраженных токсических эффектов и свидетельствует о возможности проведения его клинических испытаний.

ВЫВОДЫ

1. Ноопепт при ежедневном шестимесячном введении внутрь в дозах 10 и 100 мг/кг не вызывает необратимых патологических изменений в обследованных органах и системах у самцов и самок крыс и кроликов.
2. Ноопепт дозозависимо подавляет реакцию воспаления, развивающуюся в ответ на введение конканавалина А, стимулирует клеточный и гуморальный иммунный ответ у мышей.
3. Ноопепт не влияет на генеративную функцию, антенатальное развитие плодов и постнатальное развитие потомства крыс.
4. В экспериментах на лабораторных животных ноопепт не проявляет аллергенной, иммунотоксической и мутагенной активности.

ЛИТЕРАТУРА

1. С. С. Бойко, Р. У. Островская, В. П. Жердев др., *Биол. эксперим. биол.*, **129**(4), 426 – 429 (2000).
2. *Международные рекомендации по проведению медико-биологических исследований с использованием животных*, Совет междунар. мед. организаций, Москва (1985).
3. *Руководство по экспериментальному (доклиническому) изучению новых фармакологических веществ*, Ремедиум, Москва, (2000).
4. В. Денков, *Лаборатории животному*, из-во на БАНБ, София (1990).
5. R. U. Ostrovskaya, G. A. Romanova, I. V. Barskov, et al., *Behavioural Pharm.*, **10**, 549 – 553 (1999).

Поступила 05.02.2001

PRECLINICAL CHARACTERIZATION OF THE TOXICITY OF NOOPEPT

L. P. Kovalenko, N. M. Smol'nikova, S. V. Alekseeva, E. P. Nemova, A. V. Sorokina, M. G. Miramedova, S. P. Kurapova, E. I. Sidorina, A. V. Kulakova, and N. O. Daugel'-Dauge

Laboratory of Drug Toxicology, Institute of Pharmacology, Russian Academy of Medical Sciences, Baltiiskaya ul. 8, Moscow, 125315 Russia

Within the framework of a preclinical investigation, the new nootrope drug noopept (N-phenyl-acetyl-L-propyl-glycine ethylate) was tested for chronic toxicity upon peroral administration in a dose of 10 or 100 mg/kg over 6 months in both male and female rabbits. The results of observations showed that noopept administered in this dose range induced no irreversible pathologic changes in the organs and systems studied and exhibited no allergenic, immunotoxic, and mutagen activity. The drug affected neither the generative function nor the antenatal or postnatal progeny development. Noopept produced a dose-dependent suppression of inflammation reaction to concanavalin A and stimulated the cellular and humoral immune response in mice.