

ФАРМАКОЛОГИЯ РЕПРОДУКТИВНОЙ СИСТЕМЫ

ВЛИЯНИЕ КАЛЬЦИЕВОЙ СОЛИ N-(5-ГИДРОКСИНИКОТИНОИЛ)-L-ГЛУТАМИНОВОЙ КИСЛОТЫ НА РЕПРОДУКТИВНУЮ ФУНКЦИЮ, ПРЕНАТАЛЬНОЕ И ПОСТНАТАЛЬНОЕ РАЗВИТИЕ КРЫС

А. В. Киселев¹, С. В. Стовбун¹, В. И. Сергиенко²

Проведено исследование безопасности нового ноотропного и нейропротекторного средства — кальциевой соли N-(5-гидроксиникотиноил)-L-глутаминовой кислоты (ампасе). Ампасе в дозе 6,7 мг/кг (10-кратная максимальная терапевтическая доза для человека) при внутримышечном введении не влияет на репродуктивную функцию подопытных животных, не оказывает эмбриотоксического и тератогенного действия.

Ключевые слова: ампасе, эмбриотоксичность, тератогенность, репродуктивность крыс

ВВЕДЕНИЕ

Нарушения когнитивных процессов часто развиваются на фоне нейродегенеративных нарушений мозговой ткани, возникающих при инсульте, хронической церебро-васкулярной недостаточности, нейроинфекциях и других поражениях мозга [2, 6, 7]. В таких ситуациях терапия нейропротекторами, не обладающими прямым положительным влиянием на когнитивные функции (антиоксиданты, блокаторы кальциевых каналов и др.), не всегда дает желаемое улучшение мнестических функций. В этой связи разработка принципиально новых препаратов, сочетающих нейропротекторные и ноотропные свойства, представляется весьма актуальной.

Ранее в Российской Федерации при использовании данного подхода был создан, экспериментально изучен и апробирован в клинических условиях в качестве ноотропного средства препарат нооглютил ((N-(5-гидроксиникотиноил)-L-глутаминовой кислоты) [1, 3]. С целью создания эффективного и малотоксичного соединения, сочетающего психотропные и нейропротекторные свойства, нами синтезирована и изучена кальциевая соль N-(5-гидроксиникотиноил)-L-глутаминовой кислоты (ампасе) [4]. Установлено, что у ампасе отсутствуют побочные эффекты седативного и миорелаксантного характера при сохранении ноотропного и нейропротекторного действия. По сравнению пирацетамом и мексидолом ампасе обладает выраженным эффектом в меньших дозах. Целью настоящего исследования явилось изучение эмбриотоксических, терато-

генных свойств ампасе, а также его влияния на репродуктивные функции крыс.

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

Изучение потенциальных эмбриотоксических и тератогенных свойств ампасе, а также его влияния на репродуктивные функции проводили в соответствии с рекомендациями ФГУ “Научный центр экспертизы средств медицинского применения” [5]. Ампасе вводили внутримышечно в дозе 6,7 мг/кг, что превышает в 10 раз максимальную терапевтическую дозу для человека.

Эксперименты по изучению влияния вещества на репродуктивные функции выполнены на 90 самках и самцах крыс линии Вистар. Самкам контрольной и опытной групп ежедневно в течение 2 недель (3 – 4 эстральных цикла) внутримышечно вводили физраствор или ампасе, соответственно. Самцам контрольной и опытной групп ежедневно в течение 10 недель (2 – 3 цикла созревания сперматозоидов) внутримышечно вводили физраствор или ампасе, соответственно. После окончания введения препарата сформировали три группы животных: первая — к 10 контрольным самцам подсаживали 20 контрольных самок; вторая (ампасе) — к 10 контрольным самцам подсаживали 20 опытных самок; третья (ампасе) — к 10 опытным самцам подсаживали 20 контрольных самок.

В течение двух эстральных циклов просматривали вагинальные мазки. Отмечали стадии проэструс, эструс, метаэструс и диэструс. Обнаружение в вагинальных мазках сперматозоидов считали первым днем беременности. По истечении 10 дней из беременных самок в каждой из трех групп создавали две подгруппы. Первые подгруппы самок забивали на 20-й день беременности. Подсчитывали количество плодов, резорбций, мест имплантации в полости матки, желтых тел в яичниках. На основании полученных данных вычис-

¹ Лаборатория стереохимии (зав. — Р. Г. Костяновский) Институт химической физики им. Н. Н. Семенова РАН, 119991, Москва, ул. Косыгина, 4.

² ФГУ Научно-исследовательский институт физико-химической медицины ФМБА, Москва.

ляли показатели предимплантационной и постимплантационной гибели, индексы плодовитости и беременности:

Индекс плодовитости, % = количество оплодотворенных самок · 100/количество ссаженных самок,

Индекс беременности, % = количество беременных самок · 100/количество оплодотворенных самок.

При осмотре плодов регистрировали патологические изменения (подкожные кровоизлияния и отек подкожной клетчатки, нарушения развития скелета, глазных яблок). Вторые подгруппы беременных самок оставляли на роды, наблюдая за животными: 1 раз в неделю их взвешивали и отмечали прибавку массы тела. Фиксировали дату родов, количество крысят в помете и массу тела новорожденных крысят. На 21-й день со дня родов вычисляли процент смертности, отмечали общий и средний вес крысят.

Эксперименты по изучению эмбриотоксических и тератогенных свойств проведены на 40 беременных крысах линии Вистар. Животным контрольной и опытной групп физраствор и ампасе, соответственно, вводили внутримышечно ежедневно в течение всей беременности (с 1 по 19-й день гестации) 1 раз в сутки. На 20-й день беременности проводили исследование костного скелета (по Доусону) и внутренних органов плодов (по Вильсону-Дыбану), анализ внешних аномалий и пороков развития, а также определяли по-

казатели предимплантационной и постимплантационной гибели по формулам:

Предимплантационная гибель, % = (количество желтых тел – количество мест имплантации) · 100/количество желтых тел,

Постимплантационная гибель, % = (количество мест имплантации – количество живых плодов) · 100/количество мест имплантации.

30 % от общего количества беременных самок было оставлено на роды, после которых в течение первого месяца постнатального периода проводили изучение смертности, динамики массы тела и физического развития крысят.

Значимость различий между группами определяли с помощью однофакторного дисперсионного анализа с использованием пакета программ Биостатистика, версия 4.03.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Введение ампасе самкам в течение 2 недель и самцам в течение 10 недель не влияло на показатели плодовитости крыс в обеих опытных группах по сравнению с контрольной группой (табл. 1). Не было выявлено изменений таких показателей репродуктивной функции крыс, как количество желтых тел, мест имплантации, живых плодов, количество резорбций. Величины пред- и постимплантационной гибели в обеих

Таблица 1. Влияние длительного введения ампасе (самкам в течение 2 недель и самцам в течение 10 недель) на показатели плодовитости, состояние репродуктивной функции крыс и постнатальное развитие крысят

Исследуемые показатели	Группы животных		
	Контроль	Ампасе (вводили самкам)	Ампасе (вводили самцам)
Количество ссаженных самок, абс.	20	20	20
Количество оплодотворенных самок, абс.	15	16	15
Количество беременных самок, абс.	12	12	13
Индекс плодовитости, %	75	80	75
Индекс беременности, %	80	75	86
Количество беременных самок, абс.	12	12	13
Количество желтых тел	10,0 ± 0,5	10,5 ± 1,5	10,6 ± 1,2
Количество мест имплантации	8,8 ± 0,6	9,4 ± 1,6	9,4 ± 0,9
Количество живых плодов	8,0 ± 0,9	8,4 ± 2,2	8,6 ± 1,2
Количество мертвых плодов	0,6	0	0
Количество резорбций	0,6 ± 0,3	0,5 ± 0,2	0,6 ± 0,2
Предимплантационная гибель, %	12,0	10,5	11,3
Постимплантационная гибель, %	9,1	10,6	8,5
Масса плода, г	3,5 ± 0,2	3,2 ± 0,2	3,3 ± 0,2
Кранио-каудальный размер плода, г	3,2 ± 0,2	3,4 ± 0,2	3,3 ± 0,1
Количество родившихся крысят на 1 самку, абс.	7,8 ± 1,5	7,8 ± 0,9	8,6 ± 1,0
Постнатальная смертность крысят через 3 недели, %	2,6	2,5	2,1
Масса тела новорожденных крысят, г	5,4 ± 0,5	5,6 ± 0,5	6,1 ± 0,7
Динамика массы тела крысят, г			
1-я неделя	15,9 ± 0,6	15,8 ± 0,9	15,3 ± 0,9
2-я неделя	23,1 ± 2,2	23,0 ± 0,7	24,2 ± 1,2
3-я неделя	39,6 ± 2,5	42,5 ± 2,5	43,5 ± 2,5
4-я неделя	51,3 ± 3,4	53,7 ± 3,9	54,1 ± 3,7

опытных группах не превышали показателей контрольной группы. Масса тела эмбрионов и кранио-каудальный размер не отличались во всех трех группах (табл. 1). Прибавка массы тела беременных крыс опытных групп не отличалась от показателей контрольной группы. Продолжительность беременности и инстинкт материнства у подопытных животных, получавших ампасе, не отличались от аналогичных показателей у контрольных животных. Количество крысят на 1 крысу, как в группе самок, получавших ампасе, так и в группе самок, беременных от самцов, получавших препарат, а также масса плодов при рождении и дальнейшая прибавка массы тела новорожденных крысят в первый месяц неонатального развития достоверно не отличались от контроля (табл. 1). Физическое развитие крысят в течение 1-го месяца постнатального развития (покрытие шерстью, появление резцов, открытие глаз, отлипание ушных раковин, открытие вагины, опускание яичек и т.д.) не отличалось от сроков, характерных для нормального физиологического развития животных этого вида.

При внутримышечном введении ампасе с 1 по 19 сутки беременности прибавка массы тела беременных крыс подопытной группы не отличалась от показателей контрольной группы. Такие критерии оценки эмбриотоксичности, как продолжительность беременно-

сти, количество живых плодов, мест имплантации и желтых тел, массы тела эмбрионов и их кранио-каудальный размер у беременных крыс, получавших препарат в исследуемой дозе, статистически достоверно не отличались от соответствующих показателей у животных контрольной группы. Показатели пред- и постимплантационной гибели в опытной группе также не превышали показателей в контроле (табл. 2). При макроскопическом осмотре и микроанатомическом исследовании плодов, подвергавшихся в пренатальном периоде воздействию ампасе, не выявлено каких-либо уродств или пороков развития внутренних органов. Частота такой патологии, как внешние гематомы, гематомы в ткани тела, гидронефроз, кровоизлияния в брюшную полость и перикард в группе крыс, получавших во время беременности препарат, не отличались достоверно от показателей контрольных животных (табл. 2). При анализе тотальных препаратов, окрашенных ализарином, для изучения развития костной системы у крысиных плодов, подвергавшихся в пренатальном периоде воздействию ампасе, не выявлено пороков развития скелета. Задержка оксификации не определилась ни по одной из исследуемых точек.

При внутримышечном введении ампасе с 1 по 19 день беременности крысам не установлено влияния препарата на количество родившихся крысят. Динами-

Таблица 2. Показатели эмбриотоксического действия ампасе в дозе 6,7 мг/кг при внутримышечном введении крысам с 1 по 19 сутки беременности

Показатель	Контроль	Ампасе, 6,7 мг/кг
Продолжительность беременности, сутки	23,0 ± 0,4	23,1 ± 0,2
Количество желтых тел на 1 крысу	9,8 ± 0,6	10,2 ± 1,2
Количество мест имплантации на 1 крысу	8,6 ± 0,8	9,3 ± 1,0
Количество эмбрионов на 1 крысу	7,9 ± 1,0	8,5 ± 1,5
Количество резорбций на 1 крысу	1,0 ± 0,3	0,6 ± 0,3
Предимплантационная гибель, %	12,2	8,8
Постимплантационная гибель, %	8,1	8,6
Кранио-каудальный размер плода, см	3,3 ± 0,2	3,3 ± 0,1
Масса плода, г	3,2 ± 0,1	3,0 ± 0,2
Аномалии развития и кровоизлияния у плодов		
Внешние гематомы, абс.	0	1
Кровоизлияние в брюшную полость, абс.	0	0
Общий отек эмбриона, абс.	0	0
Гематома в ткани тела, абс.	0	0
Гидронефроз, абс.	0	0
Кровоизлияние в перикард, абс.	1	1
Показатели постнатального развития крысят		
Количество родившихся крысят на 1 крысу	7,6 ± 1,5	8,6 ± 1,5
Постнатальная смертность, %	2,9	2,8
Масса тела крысят, г		
при рождении	5,1 ± 0,3	5,7 ± 0,4
7 сутки жизни	15,7 ± 0,8	14,1 ± 0,8
14 сутки жизни	22,3 ± 2,2	24,8 ± 1,0
21 сутки жизни	35,9 ± 1,4	37,2 ± 1,9
28 сутки жизни	48,3 ± 2,9	49,7 ± 3,2

ка массы тела крысят на протяжении первого месяца жизни не отличалась от соответствующих показателей в контроле. Показатели смертности крысят, подвергавшихся в пренатальном периоде развития воздействию исследуемого препарата, также не отличались от контрольных (табл. 2). Развитие потомства в течение всего периода наблюдения по другим принятым параметрам (покрытие шерстью, появление резцов, открытие глаз, отлипание ушных раковин, открытие вагины, опускание яичек, время созревания рефлексов и др.) происходило без отклонения от сроков, характерных для нормального физиологического развития животных этого вида.

Таким образом, ампасе в дозе 6,7 мг/кг при внутримышечном введении беременным крысам с 1 по 19 день гестации не влияет на динамику массы тела беременных крыс и продолжительность беременности. Не установлено влияния препарата на показатели эмбриотоксичности и постнатальное развитие крысят. Репродуктивные показатели в опытных группах, длительное время получавших ампасе до и во время зачатия, практически не отличались от показателей контрольной группы. Ампасе не влиял на показатели постнатального развития. Следовательно, ампасе в дозе 6,7 мг/кг, составляющей 10-кратную высшую терапевтическую дозу, рекомендованную для человека, не влияет на репродуктивную функцию подопытных животных и не обладает эмбриотоксическим и тератогенным действием.

ВЫВОДЫ

1. Ампасе (кальциевая соль N-(5-гидроксиникотиноил)-L-глутаминовой кислоты) при 2-недельном введении самкам и 10-недельном введении самцам не влияет на репродуктивные показатели (количество живых плодов, масса тела эмбрионов, их кранио-каудаль-

ный размер, количество желтых тел, мест имплантации, резорбций, пред- и постимплантационная гибель) и показатели постнатального развития (количество родившихся крысят на одну самку, масса тела новорожденных крысят, постнатальная смертность крысят, динамика массы тела крысят в течение 4-х недель постнатального развития).

2. Ампасе при введении беременным крысам не изменяет динамику массы тела беременных крыс и продолжительность беременности. Не установлено влияния препарата на показатели эмбриотоксичности (количество живых плодов, показатели пред- и постимплантационной гибели, масса тела эмбрионов, их кранио-каудальный размер и др.) и постнатальное развитие крысят (развитие костного скелета, внутренних органов плодов, анализ внешних аномалий и пороков развития).

ЛИТЕРАТУРА

1. Т. А. Воронина, Т. Л. Гарибова, И. В. Хромова и др., *Фармакол. и токсикол.*, № 53 (4), 13 – 16 (1990).
2. Е. И. Гусев, В. И. Скворцова, *Ишемия головного мозга*, Медицина, Москва. (2001).
3. Е. А. Кузнецова, Т. А. Воронина, И. В. Хромова и др., *Хим.-фарм. журн.*, № 12, 1425 – 1431 (1989).
4. П. В. Якимук, С. В. Стовбун, А. А. Литвин, 2314293 РФ, *Официальный бюллетень Федеральной службы по интеллектуальной собственности, патентам и товарным знакам*. № 1 (2008).
5. *Руководство по экспериментальному (доклиническому) изучению новых фармакологических веществ*, Р. У. Хабриев (ред), ОАО “Медицина”, Москва (2005).
6. Н. Chen, J. M. McCaffery, D. C. Chan, *Cell.*, **130** (10) 548 – 562 (2007).
7. G. Pryce, D. Baker, *TRENDS in Neurosciences*, **28** (5), 272 – 276 (2005).

Поступила 16.11.10

THE INFLUENCE OF CALCIUM N-(5-HYDROXYNICOTINOYL)-L-GLUTAMATE ON REPRODUCTIVE FUNCTION, PRENATAL AND POSTNATAL DEVELOPMENT OF RATS

A. V. Kiselev¹, S. V. Stovbun¹, and V. I. Sergienko²

¹ Semenov Institute of Chemical Physics, Russian Academy of Sciences, ul. Kosigina 4, Moscow, 19991, Russia

² Scientific Research Institute of Physical-Chemical Medicine, Federal Medico-Biological Agency, ul. Malaya Pirogovskaya 1a, Moscow, 119992, Russia

The safety of a new nootrope and neuroprotector – calcium N-(5-hydroxynicotinoyl)-L-glutamate (ampasse) – has been evaluated. It is shown that ampasse at a dose of 6.7 mg/kg (10 times the maximum therapeutic dose for humans) did not affect the reproductive function in experimental animals and did not produced any embryotoxic and teratogenic effects.

Key words: Calcium N-(5-hydroxynicotinoyl)-L-glutamate, teratogenic effect, reproduction in rats