

ТОКСИКОЛОГИЯ ЛЕКАРСТВЕННЫХ СРЕДСТВ

DOI: 10.30906/0869-2092-2018-81-8-23-25

ВЛИЯНИЕ АСКОРБИНОВОЙ КИСЛОТЫ НА ОСТРУЮ ТОКСИЧНОСТЬ И ПРОТИВОЛУЧЕВЫЕ СВОЙСТВА ЦИСТАМИНА В ОПЫТАХ НА МЕЛКИХ И КРУПНЫХ ЖИВОТНЫХ

М. В. Васин, И. Б. Ушаков¹

Опыты проведены на 510 беспородных белых мышках и 101 собаке. Животных облучали гамма-квантами ⁶⁰Со в смертельных дозах и определяли противолучевые свойства цистамина в комбинации с аскорбиновой кислотой. Отдельно оценивали влияние аскорбиновой кислоты на острую токсичность цистамина. Выявлено, что в опытах на мышках аскорбиновая кислота в дозах 100 – 500 мг/кг снижает токсичность цистамина — смещение ЛД₅₀ около 20 %. Аскорбиновая кислота в дозе 200 мг/кг в опытах на собаках также снижала токсичность цистамина со смещением ЛД₅₀ препарата с 74,5 (65,4 – 84,5) до 111,0 (105,2 – 117,1) мг/кг. Цистамин в опытах на мышках и собаках обладал выраженной противолучевой активностью, обеспечивая выживаемость 56 – 63 % животных при 100 % смертности в контрольной группе на облучение. При применении цистамина в сочетании с аскорбиновой кислотой полностью сохранялись его противолучевые свойства.

Ключевые слова: острая токсичность; цистамин; аскорбиновая кислота; противолучевые свойства; собаки.

ВВЕДЕНИЕ

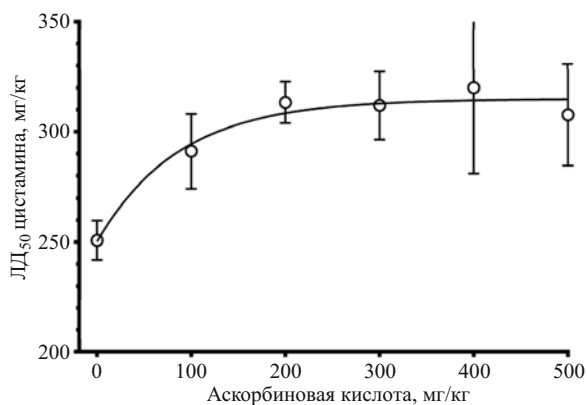
Цистамин был первым соединением, у которого обнаружены свойства радиопротектора. В настоящее время цистамин изучается и проходит клинические испытания как лекарственное средство для снижения проявления нейродегенеративных заболеваний благодаря его способности блокировать активность транскляптаминазы [6]. Препарат применяется для лечения наследственного заболевания цистиноза. Цистамин также рассматривается как пищевая добавка для стимуляции роста сельскохозяйственных животных благодаря активации соматотропной оси гормонов под его воздействием [3]. Принимая во внимание возможное длительное повторное его применение для достижения терапевтического эффекта, вопрос переносимости препарата в этих условиях представляется весьма важным. Известно, что элиминация токсического эффекта цистамина происходит более медленно, чем исчезновение его специфической активности [1]. Имеет место кумуляция токсических эффектов аминотиолов при ежедневном повторном применении в больших дозах, причем при данном режиме применения цистамин полностью теряет противолучевую эффективность [1]. Данные сведения были получены в опытах на мышках. У крупных животных (собак) при 5-кратной более низкой интенсивности метаболизма, по сравнению с мелкими лабораторными животными, замедление элиминации побочного (токсического) последствия аминотиолов может существенно огра-

ничивать реализацию специфической активности цистамина [7]. Впервые способность снижения токсичности радиопротекторов с помощью природных антиоксидантов при сохранении их противолучевых свойств была обнаружена в работах П. П. Саксонова и соавт., и затем подтверждена в последующих исследованиях [2]. Известно, что аскорбиновая кислота способна снижать токсичность химиотерапевтических препаратов [4]. Важно отметить, что аскорбиновая кислота также снижает кумулятивную токсичность аминотиолов [1]. Обоснованием для проведения настоящего исследования послужило отсутствие экспериментальных данных о влиянии природных антиоксидантов на острую токсичность и радиозащитное действие аминотиолов в опытах на крупных животных, что затрудняет оценку реальных возможностей аскорбиновой кислоты по улучшению переносимости цистамина у человека. Аскорбиновая кислота в виде лекарственной формы имеет определенные предпочтения для ее применения в клинических условиях перед другими природными антиоксидантами, применяемыми в форме биологических активных добавок. По отмеченным выше причинам аскорбиновая кислота и цистамин как лекарственные средства были отобраны для настоящего изучения.

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Опыты проведены на 510 беспородных белых мышках-самках массой 22 – 24 г и 101 собаке обоего пола массой от 5 до 11 кг (центральный питомник лабораторных животных РАН). Животных подвергали однократному общему гамма-облучению ⁶⁰Со в смертельных дозах 8,5 Гр при мощности дозы 32,0 – 33,1 сГр/мин

¹ ФГБУ ГНЦ — Федеральный медицинский биофизический центр им. А. И. Бурназяна Федерального медико-биологического агентства, Россия, 123182, Москва, ул. Живописная, 46.



Влияние аскорбиновой кислоты на острую токсичность цистамина в опытах на мышах. Представлены доверительные границы при $p = 0,05$. Препараты вводили одновременно внутривентриально, по каждой точке на графике представлены данные, полученные на 70 животных (общее количество 420 мышей).

(мышь), 4,0 и 4,5 Гр при мощности дозы 14,5 – 15,7 сГр/мин (собаки). Мышей облучали по 10 особей в пластиглазовом пинале с перфорированными отверстиями по 5 мм и отдельными делениями для каждого животного. Собак облучали в станке с левого бока каждую отдельно.

Цистамин дихлоргидрат растворяли в дистиллированной воде и вводили внутривентриально собакам в области 2 см ниже правого ребра в объеме 5 мл, а мышам в нижней области живота в объеме 0,2 мл. При пероральном применении радиопротектора мышам цистамин вводили через зонд в желудок в объеме 0,5 мл. Аскорбиновую кислоту растворяли в растворе цистамина. Расчет дозы цистамина проводили по основанию вещества.

Острую токсичность цистамина определяли при внутривентриальном введении возрастающих доз для мышей с 200 до 360 мг/кг с интервалами между ними по 20 – 30 мг и для собак с 70 до 120 мг/кг с интервалами по 10 мг. Аскорбиновую кислоту применяли у мышей в дозах от 100 до 500 мг/кг с интервалами по 100 мг, а у собак в дозе 200 мг/кг. В каждой группе мышей по 10 животных.

Таблица 1. Острая токсичность цистамина в опытах на собаках при совместном внутривентриальном применении с аскорбиновой кислотой (200 мг/кг) в течение 3 сут после введения

Доза цистамина, мг/кг	Цистамин		Цистамин + аскорбиновая кислота	
	количество животных	выживаемость, %	количество животных	выживаемость, %
70,0	6	66,7	-	-
80,0	7	28,6	-	-
90,0	8	0	-	-
100,0	7	0	8	87,5
110,0	5	0	9	55,6
120,0	-	-	16	16,8

Примечание: ЛД₅₀ цистамина = 74,5 (65,4 – 84,5) мг/кг, ЛД₅₀ цистамина + аскорбиновая кислота = 111,0 (105,2 – 117,1) мг/кг.

Для оценки противолучевого эффекта радиопротектора одного или совместно с аскорбиновой кислотой цистамин вводили мышам перорально в дозе 600 мг/кг в объеме 0,5 мл за 30 мин до облучения, собакам — внутривентриально в дозе 60 мг/кг за 5 мин до облучения. Аскорбиновую кислоту применяли совместно с цистамином в одном растворе в опытах на мышах и собаках в дозе 200 мг/кг.

Противолучевой эффект радиопротектора оценивали по выживаемости животных в течение 30 сут и по средней продолжительности жизни погибших за этот срок животных. Токсический эффект цистамина определяли по ЛД₅₀ препарата при наблюдении за животными в течение 3 сут. В работе соблюдались международные принципы Хельсинской декларации о гуманном отношении к животным.

Расчет ЛД₅₀ цистамина проводили методом пробит-анализа с определением доверительных границ при $p = 0,05$ в модификации Литчфильда — Вилкоксона. Достоверные различия между экспериментальными данными оценивали по t -критерию Стьюдента и точному критерию Фишера. При статистической обработке средней продолжительности жизни погибших животных определяли среднюю величину и стандартную ошибку.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Отмечено снижение токсичности радиопротектора цистамина по смещению ЛД₅₀ препарата на 20 % при применении аскорбиновой кислоты, начиная с дозы 100 мг/кг, при достижении плато при дозах с 200 до 500 мг/кг (рисунок).

В опытах на собаках аскорбиновая кислота в дозе 200 мг/кг повышала ЛД₅₀ цистамина с 74,5 (65,4 – 84,5) до 111,0 (105,2 – 117,1) мг/кг (табл. 1).

Гибель животных от цистамина, вводимого в токсических дозах, возникала в течение ближайших часов после его применения, в отдельных случаях собаки погибали через 1 – 3 сут.

Снижение токсичности цистамина под влиянием аскорбиновой кислоты не влияло на его противолучевые свойства. Как видно из табл. 2, цистамин в дозе 600 мг/кг при пероральном применении без или с аскор-

Таблица 2. Противолучевые свойства цистамина (600 мг/кг) после однократного совместного перорального применения с аскорбиновой кислотой (200 мг/кг) при гамма-облучении мышей в дозе 8,5 Гр

Группа	Количество мышей	Выживаемость, %	Средняя продолжительность жизни, сут ($M \pm m$)
Контроль на облучение	20	0	10,3 ± 0,8
Цистамин	34	55,9*	13,7 ± 1,6
Цистамин + аскорбиновая кислота	36	58,3*	12,4 ± 1,3

* $p < 0,01$ по точному критерию Фишера при сравнении с контрольной группой на облучение.

Таблица 3. Противолучевые свойства цистамина (60 мг/кг) в опытах на собаках при совместном внутрибрюшинном применении с аскорбиновой кислотой (200 мг/кг)

Группа	Количество животных	Доза облучения, Гр	Выживаемость, %	Средняя продолжительность жизни, сут
Контроль на облучение	7	4,0	0	14,0 ± 0,9
Цистамин	8	4,0	62,5*	13,7 ± 2,0
Цистамин + аскорбиновая кислота	8	4,0	75,0*	11,0
Контроль на облучение	4	4,5	0	9,2 ± 1,4
Цистамин	4	4,5	25,0	17,3 ± 2,8 [#]
Цистамин + аскорбиновая кислота	4	4,5	25,0	18,3 ± 2,0 [#]

* $p < 0,05$ по точному критерию Фишера при сравнении с контрольной группой на облучение;
[#] $p < 0,05$ по t -критерию Стьюдента при сравнении с контрольной группой на облучение.

биновой кислотой за 30 мин до облучения мышей защищает до 55 – 60 % животных от смертельного лучевого поражения.

Подобный защитный эффект цистамина без и с аскорбиновой кислотой имеет место в опытах на собаках при его внутрибрюшинном применении в дозе 60 мг/кг (табл. 3).

Как известно, цистамин при парентеральном применении вызывает резкое снижение АД, что сопровождается учащением частоты сердечных сокращений и дыхания [1]. Гибель животных, связанная с применением радиопротектора в токсических дозах, наступает в большинстве случаев при явлениях острой гипоксии мозга и остановки дыхания после клонико-тонических судорог.

Цистамин, являясь в радиозащитных дозах антиоксидантом, в токсических дозах индуцирует перекисные процессы за счет образования тиоловых радикалов и активных форм кислорода в процессе метаболического распада аминотиола в организме. Максимальная генерация 6,9 мкМ H₂O₂ происходит при концентрации цистамина в клетках 0,6 мМ [1]. Механизм антиоксидантного

действия аскорбиновой кислоты, как и других природных антиоксидантов, связан с субстратной поддержкой антиоксидантного потенциала клеток за счет восстановления эндогенного уровня восстановленного глутатиона, который снижается при интенсивных перекисных процессах во время реализации метаболической фазы отравления [5]. Ранее отмечалось, что токсичность аминотиолов можно снизить при стимуляции антиоксидантной системы организма, а также при применении биофлавоноидов и тиоловых антидотов при сохранении противолучевых свойств радиопротектора [1, 2]. В этих условиях увеличивается широта терапевтического действия препарата. С учетом снижения токсичности аминотиолов при комбинированном применении с природными антиоксидантами и при этом возможности увеличения дозы радиопротекторов можно ожидать повышение эффективности противолучевых средств, принимая во внимание линейный характер зависимости доза — эффект [1].

ВЫВОД

Аскорбиновая кислота в дозах 100 – 500 мг/кг при однократном внутрибрюшинном совместном применении с цистамином в дозах 60 – 350 мг/кг, вводимом также однократно внутрибрюшинно, в опытах на мелких и крупных животных способна снизить токсичность радиопротекторного препарата на 20 – 50 % ($p < 0,05$) при сохранении его противолучевых свойств.

ЛИТЕРАТУРА

1. М. В. Васин, *Противолучевые лекарственные средства*, РМАПО, Москва (2010).
2. П. П. Саксонов, В. С. Шашков, П. П. Сергеев, *Радиационная фармакология*, Медицина, Москва (1976).
3. M. C. Barnett, R. S. Hegarty, *Animal. Production Sci.*, **56**(8), 1330 – 1338 (2016).
4. S. Celebi, M. M. Gurdal, M. H. Ozkul, et al., *Eur. Arch. Otorhinolaryngol.*, **270**(4), 1293 – 1297 (2013).
5. N. V. Cherdyntseva, A. A. Ivanova, V. V. Ivanov, et al., *J. Cancer Res. Ther.*, **9**(3), 364 – 369 (2013).
6. C. Gibrat, F. Cicchetti, *Prog. Neuropsychopharmacol. Biol. Psychiatry.*, **35**(2), 380 – 389 (2011).
7. M. V. Vasin, I. B. Ushakov, *J. Radiat. Res.*, **56**(1), 1 – 10 (2015).

Поступила 01.04.18

THE INFLUENCE OF ASCORBIC ACID ON ACUTE TOXICITY AND RADIOPROTECTIVE PROPERTIES OF CYSTAMINE IN EXPERIMENTS ON SMALL AND LARGE ANIMALS

M. V. Vasin and I. B. Ushakov

A. I. Burnazyan Federal Medical Biophysics Center, Federal Medico-Biological Agency of Russia, ul. Zhivopisnaya 46, Moscow, 123182 Russia

Experiments were carried out on 510 white outbred mice and 101 dogs gamma-irradiated from 60Co source in lethal doses. Radioprotective properties of cystamine in combination with ascorbic acid were studied. Separately, the effect of ascorbic acid on acute toxicity of cystamine was evaluated. In the experiments on mice, ascorbic acid in doses of 100 – 500 mg/kg reduced the toxicity of cystamine as manifested by LD₅₀ shift of about 20%. In experiments on dogs, ascorbic acid in a dose of 200 mg/kg also reduced toxicity of cystamine by LD₅₀ shift from 74.5 (65.4 – 84.5) mg/kg to 111.0 (105.2 – 117.1) mg/kg. In experiments on both mice and dogs, cystamine showed expressed radioprotective activity, providing 56 – 63% survival of animals versus 100% mortality in control irradiated group. Combined application of cystamine with ascorbic acid fully retained radioprotective properties of cystamine.

Keywords: cystamine; ascorbic acid; acute toxicity; radioprotective properties; dogs.