

ТОКСИКОЛОГИЯ ЛЕКАРСТВЕННЫХ СРЕДСТВ

ТОКСИКОЛОГИЧЕСКОЕ ИЗУЧЕНИЕ КУМАЗИДА

М. В. Белоусов¹, Т. П. Новожеева², Р. Р. Ахмеджанов¹, Л. Н. Новицкая¹, М. С. Юсубов¹,
Д. Л. Аминин³, С. А. Авилов³, В. А. Стоник³, В. И. Калинин¹

На основе суммарной гликозидной фракции выделенной из голотурии *Cucumaria japonica* в лаборатории морских природных соединений ТИБОХ ДО РАН разработан препарат кумазид, как средство профилактической иммунотерапии. Нами проведено исследование острой и хронической токсичности кумазид в объеме требований Фармакологического комитета МЗ РФ. Установлено, что кумазид при внутрижелудочном введении по параметрам острой токсичности относится к IV классу опасности — вещества малоопасные. При 3-месячном курсе введения крысам в дозах 1 – 100 мкг/кг кумазид не оказывает токсического действия на лабораторных животных.

Ключевые слова: *Cucumaria japonica*, тритерпеновые гликозиды, кумазид, острая токсичность, хроническая токсичность

ВВЕДЕНИЕ

На основе суммарной гликозидной фракции выделенной из голотурии *Cucumaria japonica* в лаборатории морских природных соединений ТИБОХ ДО РАН, разработан и стандартизован (таблица) препарат кумазид. Кумазид представляет комплекс моносультатированных тритерпеновых гликозидов со стеринами. Химическая природа: основной действующий компонент — фракция моносультатированных тритерпеновых гликозидов, в том числе — кукумариозид А₂ – 2 (рисунок), температура плавления 245 – 247°, $[\alpha]_D^{20}$ — 68,0° (с 0,2, пиридин). Препарат стабилен, хранится при температуре 0 – 4 °С в течение 10 лет. Кумазид обладает выраженной способностью повышать естественную резистентность животных к инфекциям, обусловленным широким кругом микроорганизмов, а также оказывает профилактическое и лечебное действие при поражении организма ионизирующим излучением [1 – 3]. Возможной областью применения препарата является профилактическая иммунотерапия, вспомогательная терапия при различных бактериальных заболеваниях, восстановительное лечение после радиотерапии онкологических заболеваний.

Для внедрения препарата в клиническую практику необходимо исследование острой и хронической токсичности в объеме требований доклинических исследований лекарственных средств. Оценка безвредности кумазид составила задачу настоящей работы.

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Работа проведена на 60 белых беспородных мышках-самцах массой 18 – 22 г и 200 белых беспородных крысах-самцах с начальной массой 195 – 220 г, полученных из вивария НИИ фармакологии ТНЦ СО РАМН, содержащихся в лабораторных условиях при свободном доступе к воде и пище [4].

Острую токсичность кумазид определяли в экспериментах на мышках и крысах при внутрижелудочном способе введения [4]. Исследование хронической токсичности кумазид проведено на беспородных крысах-самцах [4]. Животные были распределены случайным образом на 4 группы: 1-я группа — контрольная — получала внутрижелудочно дистиллированную воду по 1 мл на 100 г массы; 2-й группе вводили кумазид в дозе — 1 мкг/кг; 3-й — 10 мкг/кг и 4-й — 100 мкг/кг. Препарат вводили в виде водной суспензии, в желудок через зонд ежедневно, кроме воскресенья, в течение 3 месяцев.

О степени токсичности препарата судили по общему состоянию животных, динамике массы тела, изменениям показателей периферической крови (гемоглобин, эритроциты, лейкоциты, ретикулоциты, лейкоцитарная формула), функционального состояния печени (активность в сыворотке ферментов печеночного генеза), почек (суточный диурез, рН мочи, присутствие сахара, содержание белка и креатинина в моче), сердечно-сосудистой системы (показатели ЭКГ), ЦНС (тест “открытое поле”). Все показатели регистрировали до введения препарата (фон), через 1,5 и 3 месяца эксперимента.

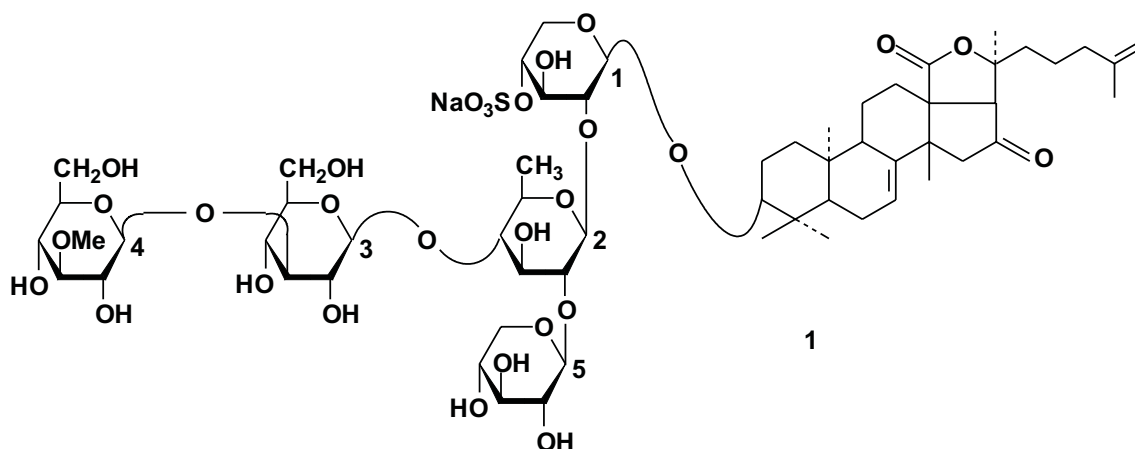
По окончании эксперимента животных 1 – 4-й групп подвергали декапитации под гексеналовым наркозом в два срока: сразу же по окончании введения и через 2 недели после отмены препарата (4-я группа). Проводили макроскопическое описание животных, органы и ткани подвергали гистологическому исследованию. Для микроскопического исследования были взяты головной мозг, мозжечок, гипофиз, легкое, сердце, желудок, тонкая и

¹ Кафедры химии и фармакологии Сибирского государственного медицинского университета, Томск, 634050, Московский тракт, 2.

E-mail: mvb63@mail.ru

² ГУ НИИ психического здоровья ТНЦ СО РАМН, Томск, 634014, п. Сосновый бор. E-mail: rgtom@mail.tomsknet.ru

³ Тихоокеанский институт биоорганической химии ДО РАН, Владивосток, 690022, проспект 100 лет Владивостоку, 159. E-mail: daminin@piboc.dvo.ru

Химическая структура основного действующего компонента — кумазида — кукумариозида $A_2 - 2(1)$.

толстая кишка, печень, почка, надпочечник, щитовидная железа, лимфоузел, селезенка, тимус, поджелудочная железа, семенник. Кусочки органов фиксировали в 12 % нейтральном формалине и заливали в парафин. Депарафинированные срезы окрашивали гематоксилин-эозином.

Результаты исследований обрабатывали, используя параметрический (t -критерий Стьюдента) метод с определением средней арифметической (X) и ее стандартной ошибки (Δx). Значимость различий считали достоверной при $p_i, p_u < 0,05$ [5]. Расчеты проводили с использованием программы Statistica 6.0 для Windows.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

При однократном внутрижелудочном введении водной суспензии кумазида мышам и крысам в максимально возможных объемах (суммарная доза более 5000 мг/кг) не выявлено нарушений координации движений, поведенческих реакций, угнетения дыхания и гибели животных. Это не позволило определить LD_{50} кумазида при данном способе введения. Таким образом, согласно ГОСТ 12.007–76, при внутрижелудочном способе введения кумазид относится к IV классу опасности — «вещества малоопасные».

Данные стандартизации кумазида

Показатель	Метод	Норма
Описание	Органолептический	Мелкий порошок желтовато-кремового цвета, аморфный, без блеска, не имеет запаха.
Растворимость	ГФ XII	Умеренно растворим в пиридине, бутаноле, очень мало растворим в воде.
Подлинность	ЯМР спектроскопия в сравнении со стандартом.	Спектры 1H ЯМР растворов препарата в пиридине и стандартного «кумазида» должны иметь одни и те же значения химических сдвигов для всех сигналов.
	Инфракрасная спектроскопия в сравнении со стандартом.	ИК-спектры препарата и стандартного «кумазида», снятые в дисках с калия бромидом, в области от 900 до 3650 см^{-1} должны иметь совпадение полос поглощения.
Температура плавления	ГФ XII	С разложением от $240\text{ }^\circ\text{C}$
Прозрачность раствора	ГФ XII	1 % раствор препарата в пиридине должен быть прозрачным
Сульфатная зола	ГФ XII	Не более 6 %
Тяжелые металлы	ГФ XII	Не более 0,001 %
Мышьяк	ГФ XI	Не более 0,0001 %
Вода	Метод К. Фишера, ГФ XI	Не более 5 %
Содержание белка	Определение белка по Лоури, ГФ XII	Не более 4 %
Остаточные органические растворители (бутанол)	ГЖХ, ГФ XII	Не более 0,5 %
Микробиологическая чистота	ГФ XII	Категория 3 Б
Количественное определение	Спектрофотометрия	Не менее 90 % основного вещества
Специфическая активность	Увеличение продукции активных форм кислорода (АФК) в макрофагах мыши	Не менее 20 % от контроля

В условиях хронического эксперимента контрольные и подопытные животные (крысы) росли и развивались нормально. К концу эксперимента привес в контрольной группе составил 117 г, в опытных 112 – 125 г. Различия массы тела крыс, получавших кумазид во всех дозах, по сравнению с контрольными животными в одинаковые сроки наблюдения статистически недостоверны.

Полученные результаты свидетельствуют об отсутствии влияния кумазида на состав периферической крови. Отмеченные изменения в содержании гемоглобина (через 3 месяца введения 100 мкг/кг кумазида), эритроцитов (через 3 месяца введения 10 мкг/кг кумазида), составе лейкоцитарной формулы (лимфоциты, моноциты) находятся в пределах физиологической нормы (Е. Д. Гольдберг и Д. И. Гольдберг, 1989).

Введение кумазида в течение 3 месяцев в дозах 1 – 100 мкг/кг не сопровождается дозозависимыми изменениями показателей ЭКГ, что свидетельствует об отсутствии отрицательного влияния кумазида на сердце крыс в условиях хронического эксперимента.

Через 3 месяца введения кумазида выявлено увеличение двигательной активности в тесте “открытое поле” (10 мкг/кг) и СПП (100 мкг/кг) по сравнению с контролем, однако, оба показателя находятся в пределах физиологической нормы. Полученные данные свидетельствуют, что кумазид не нарушает функциональное состояние ЦНС в дозах 10 – 100 мкг/кг.

Хроническое введение кумазида в дозах 1 – 100 мкг/кг не вызывает дозозависимых изменений активности ферментов печеночного происхождения в сыворотке крови крыс — щелочной фосфатазы, аланинаминотрансферазы, аспартатаминотрансферазы.

У крыс, получавших кумазид, не выявлены изменения со стороны почек. На протяжении эксперимента сохранялся нормальный объем выделенной за сутки мочи, близкие к норме значения рН мочи (6,0 – 7,0), в ней отсутствовал сахар, уровень белка и креатинина колебался в пределах физиологической нормы (И. М. Трахтенберг и соавт., 1978).

Макроскопическое исследование при вскрытии не выявило какой-либо патологии внутренних органов у животных 1 – 4-й групп. Колебания массы внутренних органов и весовых коэффициентов были, как правило, не за-

кономерны. При патоморфологическом исследовании в паренхиматозных органах животных (печень, почки, легкие, сердце), во всех отделах желудочно-кишечного тракта, железах внутренней секреции (гипофиз, щитовидная железа, надпочечники, поджелудочная железа), кровеносных и иммунокомпетентных органах (селезенка, тимус, лимфатические узлы) не обнаружено патологических отклонений, обусловленных токсическим действием препарата.

ВЫВОДЫ

1. Кумазид при внутрижелудочном введении мышам и крысам по параметрам острой токсичности относится (ГОСТ 12.007–76) к IV классу опасности — “вещества малоопасные”.

2. В хроническом эксперименте кумазид не оказал токсического влияния на общее состояние, динамику массы тела, гемограмму, сердечно-сосудистую и центральную нервную системы, функциональное состояние печени и почек крыс. На основании этих данных и результатов патоморфологического исследования внутренних органов подопытных животных установлено, что кумазид при 3-месячном курсе введения в дозах 1 – 100 мкг/кг (крысы) не оказывает заметного токсического действия на лабораторных животных.

Работа выполнялась при поддержке Госконтракта № 02.522.11.2013.

ЛИТЕРАТУРА

1. Ю. И. Гришин, Н. Н. Беседнова, В. А. Стоник и др., *Радиобиология*, **30**, Вып. 4, 556 (1990).
2. В. А. Стоник, Д. Л. Аминин, В. М. Богуславский, С. А. Авиллов, И. Г. Агафонова, А. С. Сильченко, Л. П. Пономаренко, Н. Г. Прокофьева, Е. Л. Чайкина, Патент РФ № 2271820 “Иммуномодулирующее средство кумазид и фармацевтическая композиция на его основе”. Заявка № 2004120434. Приоритет 02 июля 2004 года.
3. D. L. Aminin, V. V. Pinegin, L. V. Pichugina, et al., *International Immunopharmacology*, **6/7**, 1070 – 1082 (2006).
4. *Руководство по экспериментальному (доклиническому) изучению новых фармакологических веществ*, Москва (2000).
5. С. Гланц, *Медико-биологическая статистика*, Практика, Москва (1998).

Поступила 03.08.09

TOXICOLOGICAL CHARACTERIZATION OF CUMAZID

M. V. Belousov¹, T. P. Novozheeva², R. R. Akhmedzhanov¹, L. N. Novitskaya¹, M. S. Yusubov¹, D. L. Aminin³, S. A. Avilov³, V. A. Stonik³, and V. I. Kalinin¹

¹ Siberian State Medical University, Moskovskii trakt 2, Tomsk, 634050, Russia

² Institute of Psychological Health Research, Siberian Branch, Russian Academy of Medical Sciences, Tomsk, 634014, Russia

³ Pacific Institute of Bioorganic Chemistry, Far East Division, Russian Academy of Sciences, pr 100-letiya Vladivostoka 159, Vladivostok, 690022, Russia

* e-mail: mvb63@mail.ru

Cumazid, a new prophylactic immunotherapy preparation, has been created based on the total glycoside fraction isolated from *Cucumaria japonica* sea cucumber species. The acute and chronic toxicity of the preparation has been characterized. With respect to the acute toxicity upon intragastric administration, cumazid belongs to class IV (weakly dangerous) drugs. In 3-month chronic tests, cumazid administered in doses within 1 – 100 µg/kg did not produce any significant toxic action on laboratory animals

Key words: *Cucumaria japonica*, triterpene glycosides, cumazid, acute toxicity, chronic toxicity