

## ДОКЛИНИЧЕСКИЕ ИССЛЕДОВАНИЯ БЕЗОПАСНОСТИ (ОСТРОЙ И ХРОНИЧЕСКОЙ ТОКСИЧНОСТИ) ПОТЕНЦИАЛЬНОГО ЛЕКАРСТВЕННОГО СРЕДСТВА НА ОСНОВЕ ПЕПТИДЭРГИЧЕСКОГО НЕЙРО- И СТРЕСС-ПРОТЕКТОРА

Колобов А.А., Смирнова М.П., Кампе-Немм Е.А., Шпень В.М., Вирцев А.А., Варюшина Е.А., Александров Г.В., Захаров М.С., Кирьянова А.С., Хуттунен О.Э., Румянцева А.Б., Митрофанов И.Д., Бендт И.В., Крылова А.Э., Чистякова А.Б.

ФГУП «Государственный научно-исследовательский институт особо чистых биопрепаратов» ФМБА России, Санкт-Петербург, e-mail: a.a.kolobov@hpb.spb.ru

Целью данной работы являлись доклинические исследования безопасности потенциального лекарственного средства (ЛС) «Лизаргам, спрей назальный, дозированный» на основе пептидэргического нейро- и стресс-протектора для лечения нарушений мозгового кровообращения. Доклинические исследования были выполнены ФГУП «Гос. НИИ ОЧБ» ФМБА России. Проведенное ранее изучение специфической фармакологической активности данного потенциального ЛС показало его высокую нейропротекторную эффективность *in vivo*. При оценке возможной острой токсичности при интраназальном пути введения было продемонстрировано, что дозы потенциального ЛС, превосходящие предполагаемую терапевтическую дозу для человека в 2500 и 1250 раз, не токсичны для мышей и крыс и для кроликов соответственно. Исследование острой токсичности потенциального ЛС (при внутривенном введении) показало, что дозы изучаемого потенциального ЛС, превосходящие предполагаемую терапевтическую дозу для человека в 25000 раз для грызунов и в 20000 тысяч раз для кроликов, оказывают токсический эффект, но при этом летальные эффекты не наблюдаются. Оценка возможного местнораздражающего и пирогенного действия показала, что лекарственное средство апиrogenно и не оказывает местнораздражающего действия. Проведенное доклиническое изучение хронической токсичности показало, что дозы потенциального ЛС «Лизаргам» до 5 мг/кг (в 250 раз превосходящие терапевтическую дозу для человека) при ежедневном 90-дневном введении абсолютно не токсичны для лабораторных животных. Подсчет индекса безопасности показал, что потенциальное ЛС относится к III классу малоопасных лекарственных препаратов. Результаты проведенной работы могут быть использованы при изучении клинической безопасности потенциального ЛС «Лизаргам».

Ключевые слова: доклинические исследования, острая токсичность, хроническая токсичность, местнораздражающее действие, индекс безопасности, пептидэргический нейро- и стресс-протектор, лечение нарушений мозгового кровообращения

## PRECLINICAL SAFETY STUDIES (ACUTE AND CHRONIC TOXICITY) OF A POTENTIAL DRUG BASED ON PEPTIDERGIC NEURO AND STRESS PROTECTOR

Kolobov A.A., Smirnova M.P., Kampe-Nemm E.A., Shpen V.M., Virtsev A.A., Varyushina E.A., Aleksandrov G.V., Zakharov M.S., Kirianova A.S., Khuttunen O.E., Rumyantseva A.B., Mitrofanov I.D., Bendt I.V., Krylova A.E., Chistyakova A.B.

State Research Institute oh Highly Pure Biopreparations, Federal Agency for Medicine and Biology, Saint Petersburg, Russian Federation

The purpose of this work was preclinical studies of the safety of the potential drug "Lyzargam, nasal spray dosated" based on peptidergic neuro- and stress protector for the treatment of cerebral circulatory disorders. Preclinical investigation were carried out in the State Research Institute oh Highly Pure Biopreparations. A previous study of the specific pharmacological activity of this potential drug showed its high neuroprotecting efficacy *in vivo*. In assessing possible acute toxicity with the intranasal route of administration, it has been demonstrated that doses of the potential drug in 2500 and 1250 times greater than the intended therapeutic dose for humans are no toxic for mice and rats and for rabbits correspondingly. A study of the acute toxicity of the potential drug (when administered intravenously) showed that doses of the potential drug, exceeding the estimated therapeutic dose for humans in 25000 times for mice and rats and in 20000 times for rabbits, have a toxic effect, but no lethal effects are observed. Evaluation of a possible local irritant and pyrogenic effect has shown that the studied potential drug is non-pyrogenic and does not have a local irritant effect. A preclinical study of chronic toxicity showed that doses of the potential drug "Lyzargam" up to 5 mg / kg (250 times greater than the therapeutic dose for humans) when administered daily for 90 days are completely non-toxic to laboratory animals. The calculation of the safety index showed that the potential drug belongs to the class III

**low-hazard drugs. Thus, the results of this work may be used under investigation of clinical safety of “Lyzargam”.**

Keywords: preclinical studies, acute toxicity, chronic toxicity, local irritant effect, safety index, peptidergic neuro and stress protector, treatment of cerebral circulatory disorders

Профилактика и лечение сосудистых заболеваний головного мозга является в настоящее время важной и актуальной задачей во всем мире. Инсульт – это серьезная проблема общественного здравоохранения, поскольку ежегодно около 15 миллионов человек во всем мире переносят инсульт [1; 2]. В нашей стране инсульт поражает более 450 000 человек в год, заболеваемость и смертность от острых нарушений мозгового кровообращения находится на 2-м месте среди других заболеваний. Для того чтобы избежать высокой смертности и инвалидности, необходимо раннее выявление и адекватное лечение инсульта, а также обязательное проведение реабилитационных мероприятий, которые препятствуют возникновению рецидива. Одним из компонентов реабилитации является медикаментозная терапия с использованием церебропротекторных, ноотропных и стресс-протекторных препаратов. Одним из перспективных направлений создания новых препаратов, обладающих церебропротекторным действием, является разработка инновационных соединений на основе пептидных биорегуляторов.

Новое потенциальное лекарственное средство (ЛС) на основе пептидэргического нейро- и стресс-протектора Na-ацетил-D-лизил-лизил-аргинил-аргинил-амид является кандидатным препаратом для лечения нарушений мозгового кровообращения. Проведенные ранее доклинические исследования специфической фармакологической активности потенциального ЛС показали его высокую нейропротекторную эффективность *in vivo* [3]. Было показано, что данное потенциальное ЛС обладает антиишемической, антигипоксической, ноотропной и актопротекторной активностями [4]. Выявлено, что Na-ацетил-D-лизил-лизил-аргинил-аргинил-амид, являющийся активным фармакологическим ингредиентом потенциального ЛС, оказывает интегральное нейропротекторное действие, нормализует уровень провоспалительных цитокинов IL-1 $\beta$  и TNF- $\alpha$ , а также повышает содержание противовоспалительного интерлейкина-4 в головном мозге. Защитное действие пептида при церебральной ишемии характеризуется также нейротрофическим компонентом.

Целью данной работы являлись доклинические исследования острой и хронической токсичности потенциального ЛС «Лизаргам» на основе пептидэргического нейро- и стресс-протектора для лечения нарушений мозгового кровообращения.

### **Материалы и методы исследования**

Исследуемое потенциальное ЛС «Лизаргам, спрей назальный дозированный 0,5% и 1,0%» (далее потенциальное ЛС «Лизаргам»), один флакон потенциального ЛС содержит

активный фармацевтический ингредиент («D-лизаргам, ацетат») – 15 (0,5%) или 30 (1,0%) мг; физиологический раствор (ФР) - 3,0 мл; D-маннит - 30 мг. «D-лизаргам, ацетат» представляет собой синтетический тетрапептид последовательности Nα-ацетил-D-лизил-лизил-аргинил-аргинил-амид в виде ацетатной соли. Терапевтическая доза потенциального ЛС у человека составляет 20 мкг/кг. Эта доза рассчитывалась исходя из данных по изучению специфической активности потенциального ЛС на экспериментальных животных и коэффициента экстраполяции доз мышей и крыс на человека в соответствии с руководством Т.А. Гуськовой [9].

Доклинические исследования были выполнены на основе рекомендаций действующих методических документов [5-7]. Животные поступили из питомника РАМН «Рапполово» Ленинградской области. Основные правила содержания и ухода соответствовали правилам, принятым Европейской конвенцией по защите позвоночных животных (Страсбург, 1986 г.). Объем работ и перечень процедур был одобрен биоэтической комиссией института. Исследования проводили на 3 видах животных: белых беспородных крысах обоего пола (масса 180-200 грамм, возраст 9–10 недель), белых беспородных мышах обоего пола (19–21 г, 9–10 недель) и на кроликах породы шиншилла обоего пола (2-2,5 кг, 2-3 месяца).

Острая токсичность потенциального ЛС была изучена на мышах, крысах и кроликах. Период наблюдения после введения возрастающих доз составил 14 дней, для достижения высоких доз потенциальное ЛС вводили многократно в течение 10 часов. Эксперименты были проведены при интраназальном (и/н) и внутривенном (в/в) введении потенциального ЛС по одинаковым схемам. Мыши и крысы были случайным образом разделены на группы (по 5 самок и 5 самцов). В опытных группах мышам и крысам и/н вводили потенциальное ЛС в дозах 2, 20, 50 мг/кг; в/в - в дозах 20, 200, 500 мг/кг. И/н потенциальное ЛС вводилось животным при помощи автоматической одноканальной пипетки 10-100 мкл с соответствующим наконечником, введение осуществлялось в каждый носовой ход. В/в введение производилось в соответствии с требованиями [6], в максимальной дозе 500 мг/кг (50 мл/кг) каждой крысе вводили не более 2 мл за раз с интервалом 2 часа в течение 10 часов. Кролики были случайным образом разделены на группы (по 3 самки и по 3 самца в каждой). Кроликам в опытной группе потенциальное ЛС вводили и/н в дозе 25 мг/кг, в/в - в дозе 400 мг/кг. В контрольных группах животным по тем же схемам вводили ФР.

Во всех экспериментах проводили наблюдение за лабораторными животными в течение 14 суток после введения потенциального ЛС. Проводили клинический осмотр (ежедневно) до начала эксперимента (фоновые значения), а также выполняли взвешивание на 2, 7 и 14-й день после введения. У крыс и кроликов измеряли частоту сердечных сокращений (ЧСС) и частоту дыхательных движений (ЧДД). На 14-е сутки все животные были подвергнуты

эвтаназии и патоморфологическому исследованию.

Оценка местнораздражающего действия была проведена на 3 кроликах-самцах. На слизистую оболочку правого глаза наносили 0,1 мл 1% потенциального ЛС, на слизистую оболочку левого глаза - 0,1 мл ФР. Наблюдение проводили в течение 24 часов с момента нанесения потенциального ЛС.

Испытания на пирогенность были проведены на кроликах-самцах и соответствовали требованиям ГФ XIII, ОФС 1.2.4.0005.15 [8]. Потенциальное ЛС вводили в ушную вену в объеме 0,2 мл/кг. Температуру измеряли 2 раза до начала исследования и каждые 30 минут в течение 3 часов после введения потенциального ЛС.

Хроническая токсичность потенциального ЛС была изучена на крысах, случайным образом разделенных на 4 группы (по 15 самок и 15 самцов в каждой). Потенциальное ЛС вводили и/н ежедневно, в течение 90 дней в 3 дозах: 1 мг/кг (50-кратная терапевтическая доза для человека, минимально возможная для экспериментального введения крысам), 3 и 5 мг/кг. Хроническая токсичность потенциального ЛС была также изучена на кроликах, самцах и самках, которые были случайным образом разделены на группы (по 3 самки и 3 самца в каждой). Потенциальное ЛС вводили и/н ежедневно, в течение 90 дней в 3 дозах: терапевтической дозе для кролика - 0,06 мг/кг (доза рассчитана путем умножения терапевтической дозы для человека на коэффициент пересчета по площади поверхности тела кролика 3,2); 3 мг/кг и максимальной - 5 мг/кг (более чем в 250 раз превышающей терапевтическую дозу для человека). Крысам и кроликам в контрольных группах по той же схеме вводили ФР.

Клинический осмотр животных выполняли ежедневно, в течение эксперимента регистрировали интегральные показатели состояния организма всех животных, а также патоморфологическое и патогистологическое исследования по окончании эксперимента. Физиологические исследования проводили до начала исследования, а также на 30-й и на 90-й день после начала введения потенциального ЛС.

Офтальмологическое исследование проводили на тех же сроках, оценивая состояние слизистых оболочек, наличие правильных роговичных рефлексов и измеряя величину зрачка и ширину глазной щели. Для лабораторных исследований собирали образцы крови и костный мозг.

Клинический анализ крови выполняли на автоматическом гематологическом анализаторе Abacus Junior vet5 (Diatron, Венгрия) и на мазках крови, окрашенных по Романовскому-Гимзе. Биохимические показатели в сыворотках крови (аланинаминотрансфераза (АлАТ), аспартатаминотрансфераза (АсАТ), билирубин, глюкоза, креатинин, мочевины, общий белок, холестерин, щелочная фосфатаза) оценивали на

полуавтоматическом биохимическом анализаторе Chem-7 (Erba, Чехия). Исследование мочи выполняли на экспресс-анализаторе мочи DocUReader (ANALYTICON Biotechnologies AG, Германия). Кроме того, проводили микроскопический анализ миелограммы на мазках смывов костного мозга и подсчет количества клеток костного мозга. Все тесты выполнялись по стандартным протоколам и инструкциям производителей наборов.

На основании результатов эксперимента по изучению хронической токсичности рассчитывали расчетный безопасный курс (РБК) и индекс безопасности (ИБ) потенциального ЛС при клиническом применении в соответствии с инструкцией Т.А. Гуськовой [9].

Патоморфологическое исследование после завершения экспериментов включало в себя некропсию, макроскопическое исследование и взвешивание внутренних органов. Также рассчитывали отношение массы органа к массе тела.

Патогистологическое исследование было выполнено с использованием образцов тканей, полученных от животных, которым вводили потенциальное ЛС в максимальной дозе, а также образцов тканей от животных контрольных групп. Материал фиксировали в 10%-ном формалине, обезжизивали, заключали в парафин и изготавливали гистологические срезы, которые окрашивали гематоксилином и эозином («Биовитрум», Россия). Препараты изучали в световом микроскопе DMLB (Leica Microsystems AG, Германия).

Статистический анализ проводили с помощью программы Microsoft Excel 2007 (Microsoft Corporation). Подсчитывали средние значения и ошибки среднего ( $M \pm m$ ). Сравнение показателей между группами проводили с помощью непарного Т-критерия Стьюдента с неравными отклонениями, а также по U-критерию Манна-Уитни. Отличия считали достоверными при  $p < 0,05$ .

### *1. Оценка острой токсичности на мышах и крысах*

При интраназальном введении потенциального ЛС в дозах до 50 мг/кг крысам и мышам летальных эффектов не было зарегистрировано. Ежедневный клинический осмотр не выявил каких-либо симптомов интоксикации животных ни в одной из групп в течение эксперимента. Таким образом, дозы потенциального ЛС, вызывающие возможные летальные эффекты при и/н введении, находятся заведомо выше 50 мг/кг.

При внутривенном введении потенциального ЛС в дозах до 500 мг/кг у крыс и мышей летальных эффектов не наблюдали (таблицы 1 и 2). Было выявлено, что после введения доз 200 и 500 мг/кг у животных отмечалась гиподинамия, одышка, тремор всего тела и взъерошенность, при этом симптомы интоксикации проходили в течение 3 часов и носили дозозависимый характер. В дальнейшем в течение эксперимента клинический осмотр не выявил каких-либо симптомов интоксикации животных ни в одной из групп. Полученные результаты показали, что при в/в введении потенциального ЛС летальность

экспериментальных животных отсутствовала, то есть дозы, вызывающие возможные летальные эффекты при в/в введении, выше 500 мг/кг.

Таблица 1

Отсутствие летальных эффектов при внутривенном введении потенциального лекарственного средства «Лизаргам» мышам (пало/всего)

Доза, мг/кг	2	20	200	500
Эффект (самцы)	0/5	0/5	0/5	0/5
Эффект (самки)	0/5	0/5	0/5	0/5

Таблица 2

Отсутствие летальных эффектов при внутривенном введении потенциального лекарственного средства «Лизаргам» крысам (пало/всего)

Доза, мг/кг	2	20	200	500
Эффект (самцы)	0/5	0/5	0/5	0/5
Эффект (самки)	0/5	0/5	0/5	0/5

Во всех группах экспериментальных животных после и/н или в/в введения потенциального ЛС не было обнаружено влияния на массу тела грызунов, при этом отмечалась тенденция к увеличению массы животных к 14-му дню эксперимента, связанная с естественным приростом массы тела. Введение испытуемого потенциального ЛС крысам также не привело к достоверному влиянию на ЧСС, ЧДД и ректальную температуру экспериментальных животных.

Во всех группах наружный осмотр животных не выявил отклонений от нормы. Результаты вскрытия показали, что положение внутренних органов было анатомически правильным, а сами органы без патологических изменений. Патоморфологическое исследование, а также расчет массовых коэффициентов внутренних органов всех экспериментальных групп крыс и мышей не выявили каких-либо значимых различий между группами животных, получавшими потенциальное ЛС или ФР. Учитывая, что разовая терапевтическая доза для человека составляет в среднем 0,020 мг/кг, можно заключить, что дозы потенциального ЛС, превосходящие предполагаемую терапевтическую дозу для человека в 2500 и 1250 раз, не токсичны для мышей и крыс и для кроликов соответственно.

## *2. Оценка острой токсичности на кроликах*

При интраназальном введении потенциального ЛС кроликам в дозе 25 мг/кг летальных эффектов не наблюдалось. Ежедневный клинический осмотр также не выявил каких-либо

симптомов интоксикации животных ни в одной из групп в течение эксперимента.

При внутривенном введении потенциального ЛС в дозе 400 мг/кг летальных эффектов у кроликов не отмечали, однако наблюдалась значительная клиническая картина интоксикации. Сразу же после введения у животных отмечалось боковое положение, одышка, при этом основные рефлексы были сохранены. Состояние нормализовалось в течение часа. В дальнейшем ежедневный клинический осмотр после введения потенциального ЛС не выявил каких-либо симптомов интоксикации животных ни в одной из групп в течение эксперимента.

У кроликов во всех группах (как при и/н, так и при в/в введении потенциального ЛС) отмечали тенденцию к увеличению массы животных к 14-м суткам опыта. Не было выявлено влияния потенциального ЛС на массу тела, на ЧСС, ЧДД и ректальную температуру кроликов. Патоморфологическое исследование, а также расчет массовых коэффициентов внутренних органов всех экспериментальных групп животных не выявили каких-либо значимых различий между группами кроликов, которым вводили потенциальное ЛС или ФР (таблицы 3). Таким образом, дозы, превышающие терапевтическую дозу для человека в 1250 раз при и/н введении или в 20 000 раз при в/в введении, не токсичны для кроликов.

Таблица 3

Массовые коэффициенты (МК) органов у кроликов (г/кг веса тела) при остром внутривенном введении потенциального лекарственного средства «Лизаргам»

Орган	M±m			
	Контроль		Лизаргам, 400 мг/кг	
	Самцы	Самки	Самцы	Самки
Сердце	3,0±0,2	2,9±0,1	3,1±0,1	3,2±0,1
Легкие с трахеей	4,5±0,2	4,6±0,2	4,6±0,2	4,5±0,2
Тимус	1,7±0,1	1,8±0,1	1,7±0,1	1,6±0,1
Печень	36,2±0,5	36,7±0,4	37,0±0,3	36,1±0,4
Селезенка	0,64±0,06	0,62±0,05	0,62±0,04	0,64±0,04
Почки	7,4±0,2	7,2±0,2	7,3±0,2	7,1±0,1
Надпочечники	0,09±0,01	0,10±0,01	0,10±0,01	0,09±0,01
Головной мозг	3,4±0,2	3,3±0,1	3,3±0,1	3,2±0,1
Семенники или яичники	1,8±0,1	0,12±0,02	1,8±0,1	0,13±0,01

### 3. Изучение местнораздражающего действия

При оценке местнораздражающего действия потенциального ЛС «Лизаргам»

наблюдение за кроликами в течение 24 часов не выявило отека или гиперемии глаз экспериментальных животных, то есть потенциальное ЛС не обладало раздражающим действием при местном применении.

#### 4. Испытание на пирогенность

При испытаниях на пирогенность было показано, что после введения потенциального ЛС в группе из 3 кроликов суммарное повышение температуры составило 0,4 °С, то есть не превышало 0,6 °С. В соответствии с критериями фармакопеи ОФС 1.2.4.0005.15 такие результаты свидетельствуют об отсутствии пирогенности изучаемого потенциального ЛС.

#### 5. Изучение хронической токсичности на крысах

На протяжении эксперимента гибели подопытных животных не наблюдали, что свидетельствовало об отсутствии кумуляции потенциального ЛС в организме. Ежедневный клинический осмотр животных не выявил каких-либо значимых различий между экспериментальными группами на протяжении всего эксперимента. Не было отмечено значительных различий по массе тела, количеству потребления корма и воды между всеми экспериментальными группами.

Проведенные физиологические исследования (регистрация структуры поведения крыс в открытом поле, регистрация спонтанной двигательной активности (СДА), регистрация показателей функции внешнего дыхания, регистрация электрокардиограммы (ЭКГ), регистрация артериального давления (АД), регистрация болевой чувствительности и офтальмологическое исследование) не выявили различий в показателях между опытными и контрольной группами крыс как на 30-й, так и на 90-й день после начала введения потенциального ЛС (таблица 4). Также было показано, что применение потенциального ЛС «Лизаргам» не влияет на физиологические показатели (ЧДД, ЭКГ, ЧСС, АД, болевую чувствительность и ректальную температуру).

Таблица 4

Влияние ежедневного интраназального введения потенциального лекарственного средства «Лизаргам» на структуру поведения крыс в открытом поле

Показатель	M±m			
	Контроль	Лизаргам, 1 мг/кг	Лизаргам, 3 мг/кг	Лизаргам, 5 мг/кг
Фон				
Горизонтальная активность	44,9±1,2	45,4±1,6	45,6±1,5	44,8±1,4
Вертикальная активность	14,7±1,1	15,2±1,3	15,5±1,1	14,5±1,3
Заглядывания	5,3±0,5	5,3±0,6	5,6±0,4	5,2±0,5
Грумминг	2,2±0,2	2,3±0,2	2,5±0,2	2,5±0,3

Акты дефекации	2,2±0,2	2,1±0,2	2,4±0,3	2,2±0,2
30-е сутки				
Горизонтальная активность	45,2±1,5	44,8±1,5	44,6±1,2	45,2±1,6
Вертикальная активность	15,2±1,2	15,0±1,4	15,1±1,3	14,8±1,4
Заглядывания	5,4±0,4	4,8±0,5	5,5±0,4	5,2±0,7
Груминг	2,3±0,3	2,3±0,2	2,3±0,2	2,5±0,2
Акты дефекации	2,2±0,2	2,1±0,2	2,0±0,3	2,1±0,3
90-е сутки				
Горизонтальная активность	44,8±1,3	45,3±1,5	44,5±1,6	45,5±1,7
Вертикальная активность	14,5±1,3	15,4±1,1	15,0±1,5	15,3±1,6
Заглядывания	5,3±0,4	5,7±0,4	5,6±0,6	5,9±0,5
Груминг	2,4±0,2	2,3±0,3	2,2±0,2	2,5±0,3
Акты дефекации	2,2±0,2	2,5±0,2	2,0±0,3	2,3±0,3

Примечание: в таблице приведены данные для крыс-самцов, для самок получены аналогичные результаты.

По результатам теста «Сила хватки», позволяющего оценить влияние потенциального ЛС на нервно-мышечную функцию, значимых различий между экспериментальными группами по данному параметру не наблюдалось (таблица 5).

Таблица 5

Влияние ежедневного интраназального введения потенциального лекарственного средства «Лизаргам» на силу хватки крыс (г)

Сроки	M±m							
	Контроль		Лизаргам, 1 мг/кг		Лизаргам, 3 мг/кг		Лизаргам, 5 мг/кг	
	Самцы	Самки	Самцы	Самки	Самцы	Самки	Самцы	Самки
Фон	760±19	730±17	756±19	728±16	753±18	725±18	763±17	732±16
30-е сутки	985±17	929±15	976±18	934±19	979±17	927±18	981±18	924±17
90-е сутки	1083±17	1029±17	1094±18	1024±20	1094±19	1036±19	1092±15	1028±18

Анализ результатов лабораторных исследований, проведенных на 30-й и 90-й день эксперимента у крыс, не выявил статистически значимых изменений в гематологических показателях, а также уровнях ферментов печени, глюкозы, общего белка в сыворотке крови как в контрольных, так и в опытных группах. Не было выявлено различий, вызванных введением потенциального ЛС, в относительном содержании разных типов клеток миелограммы, общем количестве клеток костного мозга, а также по уровням маркеров

повреждения почек, анализу состава мочи и оценке функциональной активности почек.

На основании результатов хронического эксперимента был рассчитан индекс безопасности (ИБ) при клиническом применении: крысы – доза 5 мг/кг; длительность введения – 90 дней. Гибели нет.

Расчетный безопасный курс (РБК) =  $(5 \text{ мг/кг} \times 90) / (0,02 \text{ мг/кг} \times 5,9) = 3814$  дней.

Индекс безопасности (ИБ) для трехмесячного терапевтического курса =  $3814/90 = 42$ .

В соответствии с классификацией опасности лекарственных препаратов для клинического применения (ИБ > 5) потенциальное ЛС «Лизаргам, спрей назальный» относится к III классу малотоксичных лекарственных препаратов.

#### *б. Изучение хронической токсичности на кроликах*

Ежедневный клинический осмотр кроликов всех экспериментальных групп не выявил каких-либо значимых различий между группами, гибели подопытных животных не наблюдалось. Измерение массы тела показало, что данный параметр равномерно увеличивался на протяжении всего срока исследования как в контрольной, так и во всех опытных группах. Анализ показателей массы тела, потребления корма и воды, а также физиологических параметров (ЧДД, ЭКГ и ЧСС и АД) показал, что достоверные различия между всеми экспериментальными группами отсутствуют. Офтальмологическое исследование не выявило различий между экспериментальными группами, получавшими потенциальное ЛС или ФР.

Представленные в таблице 6 данные подтверждают, что ежедневное и/н введение потенциального ЛС в дозах 0,06-5 мг/кг в течение 30 и 90 дней не оказывало значительного влияния на количественный и качественный состав периферической крови кроликов. Также не было выявлено влияния потенциального ЛС на состояние красного костного мозга, биохимический состав крови, мочи и функциональную активность почек.

Таблица 6

Оценка влияния ежедневного интраназального введения потенциального лекарственного средства «Лизаргам» на показатели периферической крови кроликов-самцов

Показатель	M±m			
	Контроль	Лизаргам, 0,06 мг/кг	Лизаргам, 3 мг/кг	Лизаргам, 5 мг/кг
30-е сутки				
Количество лейкоцитов (WBC), 10 <sup>9</sup> /л	18,86±0,27	19,74±0,71	19,34±0,64	19,80±1,42
Количество эритроцитов (RBC), 10 <sup>12</sup> /л	6,06±0,23	6,18±0,18	6,47±0,24	6,54±0,34

Концентрация гемоглобина (HGB), г/л	118,0±3,6	111,3±3,8	111,7±3,2	121,3±4,5
Гематокрит (HCT), %	48,30±1,80	48,76±4,20	48,50±3,63	47,2±3,35
Средний объем эритроц. (MCV), фл	75,3±3,7	80,0±2,6	74,0±3,1	75,0±3,5
Средн. содерж. гемоглоб. в эритроц. (MCH), пг	18,1±1,0	18,7±1,3	18,1±1,1	20,8±1,6
Ср. концентрация гемоглобина в эритроц. (MCHC), г/дл	256,3±20,6	217,7±23,5	243,3±17,6	254,7±16,8
Широта распределения эритроцитов (RDWc), %	15,8±0,2	15,9±0,3	16,0±0,3	15,8±0,9
Кол-во тромбоцитов (PLT), 10 <sup>9</sup> /л	383,7±15,4	383,7±23,8	384,7±16,0	383,0±22,5
Средний объем тромбоцита (MPV), фл	6,0±0,4	6,7±0,6	7,4±0,8	6,3±0,7
Тромбокрит, (PCT), %	0,30±0,05	0,34±0,03	0,30±0,05	0,29±0,04
Широта распределения тромбоцитов (PDWc), %	30,2±0,9	32,4±1,8	30,0±1,3	30,1±0,5
Нейтрофилы, 10 <sup>9</sup> /л	7,52±0,43	6,88±0,36	6,51±0,40	6,70±1,00
Базофилы, 10 <sup>9</sup> /л	0	0	0	0
Эозинофилы, 10 <sup>9</sup> /л	0	0	0	0
Моноциты, 10 <sup>9</sup> /л	1,03±0,21	1,50±0,20	1,20±0,40	1,27±0,19
Лимфоциты, 10 <sup>9</sup> /л	10,32±0,84	11,36±0,88	11,64±0,90	11,83±1,64
90 сутки				
Количество лейкоцитов (WBC), 10 <sup>9</sup> /л	17,99±2,61	18,42±1,11	20,28±1,46	17,01±0,99
Количество эритроцитов (RBC), 10 <sup>12</sup> /л	6,98±1,36	7,66±0,83	6,66±0,80	6,73±0,80
Концентрация гемоглобина (HGB), г/л	123,3±4,9	109,7±5,8	111,0±7,4	111,7±5,2
Гематокрит (HCT), %	47,84±2,10	49,15±1,60	49,39±3,50	48,34±4,20
Средний объем эритроц. (MCV), фл	75,3±5,2	78,3±2,0	76,3±4,8	75,0±4,5
Средн. содерж. гемоглоб. в эритроц. (MCH), пг	17,3±1,3	18,4±0,6	17,5±1,2	18,8±0,7
Ср. концентрация гемоглобина в эритроц. (MCHC), г/дл	247,7±17,5	222,0±14,1	227,3±23,6	228,7±23,1

Широта распределения эритроцитов (RDWc), %	16,1±0,9	16,7±1,0	16,2±0,6	16,5±0,8
Кол-во тромбоцитов (PLT), 10 <sup>9</sup> /л	384,7±17,4	384,3±2,7	382,7±11,5	383,7±15,6
Средний объем тромбоцита (MPV), фл.	6,9±0,3	6,3±0,4	6,9±0,5	6,2±0,8
Тромбокрит, (PCT), %	0,30±0,05	0,29±0,04	0,40±0,03	0,40±0,05
Широта распределения тромбоцитов (PDWc), %	30,5±2,0	31,5±1,9	30,4±1,3	30,2±1,4
Нейтрофилы, 10 <sup>9</sup> /л	6,99±1,29	5,97±1,50	8,30±1,00	6,20±0,70
Базофилы, 10 <sup>9</sup> /л	0	0	0	0
Эозинофилы, 10 <sup>9</sup> /л	0	0	0	0
Моноциты, 10 <sup>9</sup> /л	1,40±0,20	0,89±0,16	1,02±0,37	0,95±0,20
Лимфоциты, 10 <sup>9</sup> /л	9,60±1,67	11,55±2,03	10,96±1,87	9,86±0,52

Примечание: в таблице приведены данные для кроликов-самцов, для самок получены аналогичные результаты.

Патоморфологическое исследование на 90-й день эксперимента, проведенное у животных всех экспериментальных групп (крысы, кролики), не показало отклонений от нормы и не выявило различий, связанных с длительным и/н введением потенциального ЛС. По результатам взвешивания внутренних органов животных не было выявлено различий по массовым коэффициентам органов между экспериментальными группами. Анализ результатов патогистологического исследования не показал значимых патологических изменений в тканях крыс и кроликов, которым вводили «Лизаргам» в максимальной в дозе, не было выявлено различий между опытными и контрольными группами.

На основании результатов эксперимента на кроликах был также рассчитан ИБ потенциального ЛС при клиническом применении.

Расчетный безопасный курс (РБК) = (5 мг/кг x 90) / 0,02 мг/кг x 3,2 = 7031 день.

Индекс безопасности (ИБ) для трехмесячного терапевтического курса = 7031/90 = 78, что позволяет отнести потенциальное ЛС «Лизаргам» к III классу малотоксичных лекарственных препаратов.

### **Заключение**

Таким образом, изучение острой токсичности потенциального ЛС «Лизаргам» показало, что при интраназальном введении дозы, превосходящие предполагаемую терапевтическую дозу для человека в 2500 и 1250 раз, не токсичны для грызунов и для кроликов соответственно. При внутривенном введении было выявлено, что дозы,

превосходящие предполагаемую терапевтическую дозу для человека в 25 000 тысяч раз для грызунов и в 20 000 тысяч раз для кроликов, оказывают преходящий токсический эффект, но при этом летальных исходов у животных не наблюдаются. Потенциальное ЛС является апирогенным и не оказывает местнораздражающего действия.

При изучении хронической токсичности было показано, что потенциальное ЛС в дозах до 5 мг/кг (что в 250 раз превосходит терапевтическую дозу для человека) при ежедневном 90-дневном введении абсолютно не токсично для лабораторных животных (крыс и кроликов).

В соответствии с классификацией опасности лекарственных препаратов для клинического применения потенциальное ЛС «Лизаргам, спрей назальный дозированный» на основе пептидэргического нейро- и стресс-протектора, предназначенный для лечения нарушений мозгового кровообращения, имеет индекс безопасности  $> 5$  и относится к III классу малоопасных лекарственных препаратов.

Конфликт интересов: авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

*Исследование выполнено по Государственному контракту № 14.N08.11.0096 от 25 августа 2016 г. «Доклинические исследования лекарственного средства на основе пептидэргического нейро- и стресс-протектора для лечения нарушений мозгового кровообращения» в рамках ФЦП «Развитие фармацевтической и медицинской промышленности Российской Федерации на период до 2020 года и дальнейшую перспективу».*

### Список литературы

1. Mackay J., Mensah G.A. The atlas of heart disease and stroke. World health organization and Center for disease control and prevention. [Электронный ресурс]. URL: [http://www.who.int/cardiovascular\\_diseases/resources/atlas/en](http://www.who.int/cardiovascular_diseases/resources/atlas/en) (дата обращения: 15.09.2019).
2. O'Donnell M.J., Xavier D., Liu L., Zhang H., Chin S.L., Rao-Melacini P., Rangarajan S., Islam S, Pais P., McQueen M.J., Mondo C., Damasceno A., Lopez-Jaramillo P., Hankey G.J., Dans A.L., Yusuf K., Truelsen T., Diener H.C., Sacco R.L., Ryglewicz D., Czlonkowska A., Weimar C., Wang X., Yusuf S.; INTERSTROKE investigators. Risk factors for ischaemic and intracerebral haemorrhagic stroke in 22 countries (the interstroke study): A case-control study. Lancet. 2010. V. 376. P.112–23. DOI: 10.1016/S0140-6736(10)60834-3.
3. Дейко Р.Д., Кампе-Немм Е.А., Колобов А.А., Прусаков А.Н., Шпень В.М., Штрыголь С.Ю. Тетрапептид и средство, обладающее церебропротекторной и антиамнестической активностями (варианты) // Патент РФ №2537560 от 11.11.2014 г.
4. Толкач П.Г., Башарин В.А., Гребенюк А.Н., Колобов А.А. Оценка эффективности пептида КК1 для профилактики отдаленных нарушений функций центральной нервной

системы после тяжелой интоксикации оксидом углерода в эксперименте // Обзоры по клинической фармакологии и лекарственной терапии. 2015. N 3. С.29-34.

5. Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств. Под ред. А.Н. Миронова. Часть первая. М.: Гриф и К, 2012. С. 13-51.

6. Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств / Под ред. А.Н. Миронова. Часть вторая. М.: Гриф и К, 2012. 536 с.

7. H. Hodge et al. Clinical Toxicology of Commercial Products. Acute Poisoning. Ed. IV, Baltimore. 1975. 427 p.

8. Государственная фармакопея Российской Федерации XIII издания. В 3-х томах. М.: 2015.

9. Гуськова Т.А. Токсикология лекарственных средств. М.: «Русский врач», 2003. 154 с.