

# Доклінічні дослідження лікарських засобів

Методичні рекомендації

Київ 2001

**МІНІСТЕРСТВО ОХОРОНИ ЗДОРОВ'Я УКРАЇНИ  
ДЕРЖАВНИЙ ФАРМАКОЛОГІЧНИЙ ЦЕНТР**

# **Доклінічні дослідження лікарських засобів**

Методичні рекомендації

За редакцією  
член-кореспондента АМН України  
**О.В. Стефанова**

**Київ 2001**

**ББК 52.81**  
**Д 63**  
**УДК 615.2.01**

**Доклінічні дослідження лікарських засобів**  
**(методичні рекомендації)**

За редакцією член-кореспондента АМН України О.В. Стефанова

Схвалено на засіданні науково-експертної ради  
Державного фармакологічного центру МОЗ України  
26.04.2001 р. (протокол №4)

**Редакційна колегія:**  
д.м.н. Н.В. Літвінова  
к.б.н. М.А. Філоненко-Патрушева  
д.м.н., проф. С.Б. Французова  
д.м.н. В.В. Храпак

© Видавничий дім «Авіцена», 2001 р.

## ПЕРЕДМОВА

Доклінічні випробування лікарських засобів є обов'язковим та одним з найважливіших етапів створення лікарських засобів. Відповідне виконання всього комплексу дослідницьких процедур та операцій з вивчення нешкідливості та специфічної активності потенційних лікарських засобів гарантує у подальшому їх безпечність і високу терапевтичну ефективність за умов клінічного застосування.

Створення у нашій державі ефективної системи доклінічних випробувань лікарських засобів, яка б повною мірою відповідала міжнародним вимогам, є однією з найважливіших задач на шляху розробки ефективних, безпечних конкурентоспроможних лікарських препаратів. Не менш важливим завданням є недопущення на внутрішній ринок малоефективних лікарських засобів, які не відповідають вимогам безпечності.

Все це зумовило необхідність створення даного видання, що має на меті уніфікацію методичних підходів до оцінки нешкідливості та специфічної активності лікарських засобів. У книзі узагальнено досвід провідних фахівців України з питань пошуку та доклінічного вивчення лікарських засобів. Усі методичні рекомендації були схвалені науково-експертною радою Державного фармакологічного центру МОЗ України.

Видання базується на принципах належної лабораторної практики (GLP), що має забезпечити вірогідність результатів доклінічних випробувань лікарських засобів та гарантувати їх безпечність для людини.

У зв'язі з цим до сучасних вимог Європейської хартії про гуманне відношення до тварин, зперше значну увагу приділено так званим альтернативним методам (клітинним технологіям) вивчення нешкідливості лікарських засобів з використанням клітинних моделей.

Видання містить велику кількість експериментальних методик, що використовуються при доклінічному вивченні нешкідливості та специфічної фармакологічної активності лікарських засобів. З часом воно, безсумнівно, буде доповнюватись та розширюватись. Але й у теперішньому обсязі книга є необхідною і корисною для всіх дослідників, що мають відношення до створення та виробництва лікарських препаратів, і дозволить суттєво підвищити якість експериментальних досліджень у цій галузі.

Член-кореспондент АМН України О.В. Стефанов

## Зміст

<b>Розділ I. Належна лабораторна практика (GLP)</b> .....	7
Основні терміни та поняття .....	10
Основні принципи .....	13
Короткотривалі випробування.....	44
Моніторинг відповідності випробувань принципам GLP.....	49
Альтернативні методи дослідження токсичності лікарських засобів. Застосування принципів GLP .....	59
<b>Розділ II. Доклінічне вивчення нешкідливості лікарських засобів</b> .....	73
Експериментальне вивчення токсичної дії потенційних лікарських засобів.....	74
Вивчення кумулятивних властивостей лікарських засобів при доклінічних дослідженнях.....	98
Вивчення імунотоксичної дії лікарських засобів.....	102
Експериментальне вивчення ембріотоксичної дії лікарських засобів .....	115
Вивчення гонадотоксичної дії нових лікарських засобів та їх впливу на репродуктивну функцію тварин .....	139
Доклінічне вивчення впливу лікарських засобів, що застосовуються під час вагітності, на нейроендокринні системи регуляції репродукції та адаптації у нащадків.....	153
Оцінка мутагенних властивостей нових лікарських засобів .....	166
Вивчення канцерогенних властивостей нових речовин та лікарських засобів.....	186
Морфологічні дослідження на етапі доклінічного вивчення лікарських засобів.....	196
<b>Розділ III. Оцінка специфічної фармакологічної активності лікарських засобів</b> .....	209
Експериментальне вивчення антиаритмічних та антифібриляторних лікарських засобів.....	210
Експериментальне вивчення нових кардіотонічних засобів.....	223
Експериментальне вивчення антиангінальних, протиішемічних, кардіопротекторних засобів .....	240
Експериментальне вивчення антигіпертензивних засобів .....	252
Вивчення гіполілідемічних та протиатеросклеротичних засобів.....	263
Нормовані величини основних структурних елементів ЕКГ стагевозрілих щурів-самців .....	272

Доклінічне вивчення антианемічних засобів, антикоагулянтів та фібринолітиків.....	284
Експериментальне (доклінічне) вивчення фармакологічних речовин, які пропонуються як нестероїдні протизапальні засоби .....	292
Пошук та експериментальне вивчення фармакологічних речовин, які пропонуються як ненаркотичні аналгетики.....	307
Експериментальне вивчення нових противиразкових препаратів .....	321
Експериментальне вивчення жовчогінної, холеспазмолітичної, холелітіазної та гепатопротекторної активності нових лікарських засобів.....	334
Експериментальне (доклінічне) вивчення фармакологічних речовин, що пропонуються як транквілізатори та нейролептики.....	352
Доклінічне вивчення специфічної активності протипухлинних засобів.....	361
Вивчення антивірусної дії потенційних лікарських засобів .....	371
Експериментальне вивчення нових гіпоглікемічних засобів .....	396
Доклінічне вивчення тиростатичних та тироїдстимулюючих засобів .....	409
Скринінгові дослідження речовин з передбачуваною андрогенною та антиандрогенною активністю.....	421
Експериментальне (доклінічне) вивчення лікарських препаратів, що впливають на мускулатуру матки.....	433
Доклінічне вивчення геріатричних препаратів.....	444
Доклінічне дослідження стреспротективної дії фармакологічних засобів .....	457
Доклінічні дослідження специфічної активності та нешкідливості мінеральних вод.....	472
Експериментальне вивчення біостимуляторів з природної сировини.....	497
Моделювання ендотоксичного та септичного шоку у гризунів.....	503
<b>Розділ IV. Доклінічне вивчення фармакокінетики лікарських засобів .....</b>	<b>515</b>
Доклінічне вивчення фармакокінетики лікарських засобів.....	516

## **Розділ І**

# **НАЛЕЖНА ЛАБОРАТОРНА ПРАКТИКА (GLP)**

Стефанов О.В., Бухтіарова Т.А., Соловійов А.І., Коваленко В.М., Хромов О.С., Тишкін С.М., Іванова І.В., Данова І.В.	Основні терміни та поняття Основні принципи Короткотривалі випробування Моніторинг відповідності випробувань принципам GLP
--	--

Соловійов А.І., Стефанов О.В., Коваленко В.М., Хромов О.С., Тишкін С.М., Іванова І.В.	Альтернативні методи дослідження токсичності лікарських засобів. Застосування принципів GLP
--	---



## Вступ

Законодавство з контролю за хімічними сполуками, прийняте країнами-членами Організації з економічного співробітництва та розвитку (ОЕСР), вимагає від виробника проведення лабораторних випробувань та надання результатів цих випробувань уповноваженим державним органам для оцінки потенційної небезпечності для здоров'я людини та навколишнього середовища препаратів, що виробляються. Основний принцип цього законодавства полягає в тому, що оцінка потенційної небезпеки, пов'язаної з дією хімічних речовин, повинна базуватися на даних випробувань гарантованої якості.

Уряд та промисловість дедалі більше уваги приділяють якості випробувань, на яких базується оцінка факторів ризику. В результаті, країни-учасники ОЕСР уже мають або планують розробити критерії для виконання такого роду випробувань.

Система правил Належної Лабораторної Практики, Good Laboratory Practice (GLP) спрямована на забезпечення якості та достовірності даних, отриманих в результаті проведення досліджень. Принципи GLP є адміністративною концепцією, яка охоплює організаційний процес та умови, за яких лабораторні випробування плануються, виконуються, забезпечується їхній моніторинг, здійснюється реєстрація та зберігання даних, надається звіт про результати випробувань.

З метою запобігання використанню різних схем випробувань, що могло б перешкоджати міжнародній торгівлі в галузі хімічних речовин, країни-учасники ОЕСР проголосили необхідність міжнародної уніфікації методів випробувань та використання принципів GLP.

Використання принципів GLP є надзвичайно важливим для національних органів та відомств, відповідальних за оцінку даних випробувань та визначення небезпечності хімічних сполук. Питання якості таких даних має міжнародне значення. Можливість покладатись на результати випробувань, виконаних в інших країнах, дозволяє уникнути дублювання досліджень та зайвих витрат. Більше того, принципи і методи GLP полегшують обмін інформацією та запобігають виникненню нетарифних бар'єрів для торгівлі.

Правила GLP для неклінічних лабораторних випробувань, опубліковані в США Управлінням з контролю за якістю харчових продуктів і медикаментів (FDA) у 1976 р., стали основою для роботи експертної групи, створеної ОЕСР в рамках спеціальної програми з контролю за хімічними речовинами. В ній взяли участь такі країни та організації, як Австралія, Австрія, Бельгія, Великобританія, Греція, Данія, Італія, Канада, Нідерланди, Нова Зеландія, Норвегія, США, Франція, ФРН, Швейцарія, Швеція, Японія, Комісія Європейського співтовариства, Всесвітня організація охорони здоров'я, Міжнародна організація зі стандартизації (ISO/CERTICO).

Принципи GLP, сформульовані ОЕСР у 1981 р., передбачають застосування рекомендованих стандартів з проведення широкого кола випробувань і мають на меті регламентуючі та законодавчі цілі. Принципи GLP поширюються на великий діапазон комерційних хімічних препаратів, включаючи пестициди, фармацевтичні та косметичні засоби, промислові хімічні продукти.

У звіті експертної групи, залученої до розробки принципів GLP, чітко перераховано типи випробувань, речовин (препаратів тощо), на які поширюються ці принципи, а саме:

- фізико-хімічні властивості;
- токсикологічні випробування, спрямовані на оцінку впливу (короткострокового та довгострокового) на здоров'я людини;
- екотоксикологічні випробування, спрямовані на оцінку впливу (короткострокового та довгострокового) на навколишнє середовище;
- екологічні випробування, спрямовані на оцінку хімічних перетворень у навколишньому середовищі (транспорт, біотрансформація і біоаккумуляція).

До загальної класифікації екологічних випробувань включені також випробування, спрямовані на визначення природи та кількості залишків пестицидів, їх метаболітів та пов'язаних із ними хімічних сполук щодо стійкості і їх дію через харчові ланцюжки. Єдиним винятком, зга-

даним у доповіді ОЕСР, є випробування, проведені виключно для науково-дослідних робіт та з метою моніторингу.

Найбільший досвід в дотриманні національними організаціями з моніторингу в країнах-членах ОЕСР вимог GLP на сьогодні накопичено в сферах, що належать до токсикологічних (неклінічних) випробувань. Вони традиційно вважаються надзвичайно важливими з огляду на охорону здоров'я, тому проведення токсикологічних випробувань є першочерговим завданням лабораторного випробування. Значну кількість критеріїв адекватного моніторингу в країнах-учасниках ОЕСР було розроблено на основі досвіду перевірок токсикологічних лабораторій. Неногано розроблені і методи моніторингу відповідності GLP для лабораторій, що виконують екотоксикологічні випробування.

Для полегшення взаємного визнання експериментальних даних, які надаються уповноваженим органам країнами-учасниками ОЕСР, необхідна як гармонізація процедур контролю дотримання принципів GLP, так і можливість порівняння їх якості та суворого дотримання. Розроблено документи, які стали детальним практичним посібником щодо структури, механізмів та процедур створення взаємоприйнятних у державах-членах ОЕСР національних програм моніторингу відповідності принципам GLP. Представлений матеріал стосується переважно перевірки лабораторій та включає основну частину діяльності інспекторів GLP. Перевірка лабораторій зазвичай включає часткову перевірку випробувань або спостереження за ходом їх проведення, крім того, періодична перевірка випробувань проводиться на вимогу, наприклад, контролюючого органу.

Перевірка лабораторій проводиться з метою визначення ступеню відповідності принципам GLP лабораторного устаткування та оснащення, необхідних для проведення випробувань, а також самих лабораторних випробувань; крім того, перевірка проводиться з метою визначення достовірності даних, достатніх для забезпечення належної якості остаточних даних, які дозволяють регулюючим органам провести оцінку та прийняти відповідне рішення.

У цьому документі формулюються і визначаються загальні питання, пов'язані з організацією випробування, проведенням моніторингу відповідності, проведенням випробування, контролем якості випробування тощо відповідно до принципів GLP, впроваджених ОЕСР.

## ОСНОВНІ ТЕРМІНИ ТА ПОНЯТТЯ

**Аудит випробувань** – порівняння первинних (вихідних) даних та супроводжуваних записів з проміжним або заключним звітом з метою визначення точності запису даних, відповідності проведення досліджень протоколу випробувань та стандартним операційним процедурам; одержання не наданої в звіті додаткової інформації; виявлення допущених у процесі випробувань будь-яких дій, здатних негативно вплинути на достовірність результатів.

**Відповідальний виконавець** – особа, відповідальна за весь процес проведення випробування. Відповідальний виконавець призначається керівником установи. За призначення відповідального виконавця, керівник установи повинен мати чітке уявлення про обсяги його поточного та припустимого завантаження. Головний графік робіт перераховує плановані випробування в розвитку та цілком, і повинен використовуватись як настанова в призначенні відповідального виконавця. У випадку заміни відповідального виконавця в процесі випробування (наприклад, у зв'язку зі зміною його роду діяльності), керівник установи повинен детально документувати факт заміни, причини заміни і прізвище заміної особи. Крім того, повинна бути зафіксована дата вступу заміни в силу. У план випробування повинні вноситись поправки, що відображають цю заміну, і які підписуються заміним відповідальним виконавцем, керівником установи та, у разі потреби, Замовником.

Замінний відповідальний виконавець повинен визначити в момент заміни, чи відповідає проведене випробування вимогам GLP, а у випадку яких-небудь невідповідностей, вичерпно їх документувати.

**Головний графік робіт.** Головний графік робіт є дуже важливим та корисним документом, що забезпечує ясне розуміння пересування та використання ресурсів. Головний графік робіт використовується для оцінки обсягів робіт, що виконані. Він також дозволяє ознайомитися із запланованими випробуваннями, як у розвитку, так і в цілому.

Головний графік робіт, як правило, повинен містити інформацію з наступних пунктів: ідентифікаційні атрибути випробування, тест-система, природа випробування, прізвища відповідального виконавця та головних дослідників, а також дати початку та закінчення випробування. Доцільно також включити в головний графік робіт додаткову інформацію, таку, наприклад, як дати надання звітів, дата архівування і т.д.

Головний графік робіт тест-систем повинен відображати загальні відомості про випробування, а також особистість відповідального виконавця, тоді як такий же графік для окремого місця випробування може включати тільки локальні дані і напрямок робіт, а також містити відомості про головного дослідника.

Деякі лабораторії можуть проводити як регулярні випробування, що підлягають офіційній звітності, так і нерегулярні (удосконалення методик, фундаментальні наукові випробування і т.д.). Нерегулярні випробування можуть проводитись із застосуванням правил GLP, але при зниженому контролі якості та знижених вимогах до спеціальної GLP документації. Якщо лабораторія проводить обидва типи випробувань, у головному графіку робіт повинно бути відображено, які з них є регулярними, а які ні.

**Головний дослідник.** Керівник установи у випадку багатоцентрових випробувань повинен забезпечити призначення головного дослідника, що має відповідну освіту, кваліфікацію та досвід, та розуміння яким вимог GLP достатньо для успішного керівництва фазою випробування, що делегується. Процедура заміни головного дослідника аналогічна процедурі заміни відповідального виконавця і встановлюється керівником установи.

**Замовник** – юридична або фізична особа, яка доручає та фінансує випробування.

**Зразок** – деяка кількість досліджуваної речовини або препарату порівняння.

**Інспектор** – особа, яка проводить інспекцію лабораторії від імені уповноваженого національного органу з моніторингу за дотриманням принципів GLP.

**Інспекція лабораторії** – експертиза процедур та існуючої практики проведення випробувань на предмет оцінки ступеня відповідності їх принципам GLP. Під час інспекції вивчаються керівні структури та процедури проведення випробувань в лабораторії, а також проводиться опитування провідного технічного персоналу. У звіті оцінюється якість та цілісність отриманих в лабораторії даних і складаються звіти.

**Місце випробування** – розміщення фази (фаз) випробування в разі багатоцентрових випробувань. Прізвище особи, що виступає як керівник установи в термінах GLP, повинно бути вказано в документах. Фактично на цьому рівні закріплюється загальна відповідальність за забезпечення відповідності випробування до вимог GLP. Для забезпечення врівноваженості програми та можливості її регулювання, функції керівника установи, відповідального виконавця випробування та служби контролю якості повинні здійснюватися різними людьми. Управління засобами проведення випробування відрізняється від служби управління випробуванням, яка відповідає за загальне проведення багатоцентрового випробування і функції якої будуть розглянуті нижче в цьому документі.

**Моніторинг дотримання принципів GLP** – періодична інспекція лабораторій та/або перевірка випробувань з метою підтвердження відповідності принципам GLP.

**Належна лабораторна практика (GLP)** – сукупність правил, що стосуються організації та умов, за яких лабораторні випробування плануються, виконуються, коректуються і надаються у вигляді звіту.

**Національна програма з контролю за дотриманням принципів GLP** – докладна схема, встановлена кожною окремою державою з метою моніторингу відповідності принципам GLP установ (лабораторій), розташованих на її території шляхом проведення інспекцій та перевірки досліджень.

**Національний уповноважений орган з моніторингу дотримання принципів GLP** - керівний орган держави, який відповідає за здійснення контролю за дотриманням установами (лабораторіями) принципів GLP на її території, а також виконання інших функцій, пов'язаних із дотриманням принципів GLP. Держава ЄС може заснувати більше, ніж один такий орган.

**Носій (розчинник)** – будь-який агент, який використовується для змішування, диспергування, розчинення випробовуваної речовини чи препарату порівняння з метою сприяння умовам їх введення у тест-систему.

**Обов'язки керівника установи.** Головним обов'язком керівника установи є забезпечення випробування достатньою кількістю кваліфікованого персоналу, відповідними засобами, обладнанням та матеріалами, які необхідні для своєчасного й адекватного проведення випробування. Засоби проведення випробування включають персонал, приміщення та обладнання, що необхідні для проведення випробування.

**Первинні дані** - усі вихідні лабораторні записи та документація або засвідчені їх копії, які є результатом вихідних спостережень та роботи в процесі виконання випробувань.

**Плани лабораторій.** Плани лабораторій є важливими документами, оскільки вони демонструють якість організації лабораторії та ступінь адекватності поділу функцій та діяльності. План лабораторії може бути не занадто детальним, на відміну від інженерного плану, проте він повинен бути датований і повинен відображати головні функціональні площі, такі як сховище досліджуваних зразків, робочі місця та архіви. Плани лабораторій повинні бути архівовані.

**Препарат порівняння** - добре відома хімічна речовина або суміш, що використовується як основа для порівняння з речовиною, що випробовується.

**Проба** - матеріальне похідне тест-системи, призначене для випробування, аналізу або зберігання.

**Протокол випробування** - документ, що визначає загальний обсяг випробування.

**Реєстрація персоналу.** Відповідно до вимог GLP, керівник установи повинен забезпечити реєстрацію даних про кваліфікацію, освіту, досвід кожного працівника, а також наявність посадових інструкцій. Крім того, необхідно забезпечити ясне розуміння персоналом функцій, які він повинен виконувати, а в разі потреби проводити відповідне навчання. Як правило, відомості про кваліфікацію, освіту, досвід і послужний список подається у вигляді автобіографії.

Посадові інструкції повинні подаватись відповідно до правил GLP, тобто вони повинні містити найменування роботи, необхідний досвід та освіту працівника для її виконання, а також перелік основних процедур, що входять у компетенцію GLP. Посадові інструкції повинні бути підписані службовцем та керівником.

Документ про навчання, як правило, складається у формі переліку процедур, які службовець може виконувати без стороннього нагляду після навчання. Записи про навчання вважаються ключовими GLP документами, оскільки вони відображають процедури, виконання котрих гарантовано даним працівником. Одним із методів, що можуть бути використані керівником установи, відповідальним виконавцем або службою контролю якості для визначення придатності працівника для виконання даної процедури, є вивчення документів про навчання.

Завжди повинна передбачатись можливість перенавчання в зв'язку, наприклад, із довгою відсутністю співробітника, або з технічною модифікацією операції.

Опис записів про навчання повинно міститися в СОП, де повинно бути зазначено, хто повинен мати записи про навчання і хто санкціонує такі записи. Відповідно до принципів GLP, записи про навчання передбачаються для всіх категорій персоналу, аж до відповідального виконавця. У СОП повинно бути визначено, де проводяться записи про навчання, а також відзначено, що ці записи направляються в архів у випадку, якщо подальша діяльність працівника виходить за рамки вимог GLP. У СОП також визначається необхідність документування відвідування працівником курсів та конференцій.

У деяких випадках, зокрема, для добре навченого персоналу, можливо самостійне навчання. Доцільність і можливість самонавчання повинно визначатись керівником установи.

**Речовина, що випробується** – хімічна (біологічна) речовина або суміш, що підлягає випробуванню.

**Серія** – обмежена кількість або партія досліджуваної речовини або речовини порівняння, одержаної протягом певного циклу виробництва способом, який передбачає забезпечення дотримання тотожності, і відповідно позначається.

**Сітковий графік.** Повинен бути сформований сітковий графік випробування, у якому ідентифікуються головні керівники випробування, відповідальні за дотримання правил GLP, а також визначаються основні лінії зв'язку та звітності між тест-системами. Графік повинен відображати основні області робіт, що мають відношення до GLP, крім того, у ньому повинні бути зазначені особи, що несуть відповідальність перед GLP-організаціями. Графік повинен включати список осіб, що можуть бути призначені відповідальним виконавцем та головним дослідником (в разі необхідності). Доцільно також включити в карту відомості про керівника лабораторії, контролера тестових препаратів, адміністратора СОП, архіваріуса та персонал служби контролю якості. Сітковий графік, список відповідальних виконавців та головних дослідників повинен бути переданий в архів.

**Служба контролю якості** – система внутрішнього контролю, призначена для підтвердження того, що випробування проводиться відповідно до правил GLP.

**Стандартна операційна процедура (СОП)** – опис технологічного процесу або методики проведення певних лабораторних випробувань або робіт, викладений у письмовому вигляді. Ці процедури не описуються детально в протоколі випробувань та методичних посібниках. Обов'язком керівника установи є призначення особи, що відповідає за ведення системи СОП. Функції цієї особи полягають у перевірці СОП за визначений проміжок часу, у своєчасному введенні нових і удосконалених СОП, у відповідному розподілі СОП, а також у забезпеченні ведення історичного файлу СОП, який поповнюється. У випадку багатоцентрових випробувань може виникнути необхідність призначення особи, що несе відповідальність за організацію та контроль СОП для кожного місця випробувань. Процедура введення СОП, організованих таким чином, повинна бути уточнена в плані випробувань.

**Статус відповідності принципам GLP** – рівень дотримання лабораторією принципів GLP, визначений уповноваженим національним органом, який проводить моніторинг дотримання принципів GLP.

**Тест-система** – тварини, рослини, мікроорганізми, а також клітинні, субклітинні, хімічні або фізичні системи чи їх комбінації, що використовуються у випробуваннях. Тест-система може включати в себе також складні екологічні системи.

**Уповноважений регулюючий орган** – національний орган, який несе юридичну відповідальність щодо всіх питань контролю за хімічними речовинами.

**Установа (лабораторія), яка проводить випробування** – персонал, приміщення та діючі пристрої, необхідні для проведення випробувань.

## ОСНОВНІ ПРИНЦИПИ

**Обов'язки керівника установи.** Керівник установи повинен при проведенні випробувань забезпечувати дотримання співробітниками принципів GLP. Основними функціями керівника установи є:

- забезпечувати наявність кваліфікованого персоналу, відповідних приміщень, устаткування та матеріалів;
- мати дані про кваліфікацію, стажування, навчання, досвід персоналу та перелік посадових обов'язків на кожного спеціаліста та технічного працівника;
- гарантувати чітке розуміння співробітниками функцій, які вони повинні виконувати і, в разі потреби, забезпечувати можливість навчання для виконання цих функцій;

## Належна лабораторна практика (GLP)

- гарантувати співробітникам дотримання техніки безпеки у відповідності з національним та/або міжнародним положеннями;
- забезпечувати розробку та дотримання відповідних СОП;
- забезпечувати наявність служби гарантії якості з відповідним персоналом;
- при необхідності узгоджувати із замовником протокол випробувань;
- гарантувати, що поправки до протоколу випробувань узгоджені і задокументовані;
- зберігати копії всіх протоколів випробувань;
- зберігати архівний файл усіх СОП;
- для кожного випробування забезпечувати наявність достатньої кількості співробітників з метою своєчасного і належного його виконання;
- до початку випробування призначати в рамках кожного випробування особу відповідної кваліфікації, з практичними навичками і досвідом роботи як відповідальний виконавець. У разі необхідності заміни відповідального виконавця потрібно зафіксувати це документально;
- забезпечувати призначення особи, відповідальної за керівництво архівними справами (завідувача архівом).

**Управління окремим випробуванням.** При багатоцентрових випробуваннях, обов'язки місцевого управління випробуванням наведені в табл. 1А, за винятком:

- а) призначення та заміни відповідального виконавця;
- б) затвердження протоколу випробувань відповідальним виконавцем;
- в) ознайомлення із затвердженим протоколом персоналу служби гарантії якості;
- г) забезпечення надійного зв'язку і взаємодії між відповідальним виконавцем, головними дослідниками, персоналом випробування та службою гарантії якості.

**Відповідальний виконавець.** Відповідальний виконавець повністю контролює проведення випробування і несе основну відповідальність за науковість проведення випробування в цілому, що є основною функцією відповідального виконавця, і, згідно з принципами GLP, визначає його відповідальність та обов'язки. Досвід показав, що, доти, поки відповідальність за належне проведення випробування не буде покладена на одну людину, існує можливість одержання персоналом суперечливих інструкцій, що може призвести до неналежного виконання протоколу випробування. У кожний окремий момент може бути лише один відповідальний виконавець. Проте, деякі з обов'язків відповідального виконавця можуть бути делеговані, наприклад, у випадку субпідрядного випробування. При цьому відповідальний виконавець виступає як гарант того, що наукові, адміністративні та законодавчі аспекти випробування контролюються. Відповідальний виконавець виконує це шляхом координації управління, наукового/технічного штату та програми забезпечення контролю якості (табл. 1Б).

З погляду науки, відповідальний виконавець звичайно є науковцем, відповідальним за створення та затвердження проекту протоколу випробування, а також за збір даних, їх аналіз та звіт. Відповідальний виконавець відповідає за остаточні висновки, отримані в результаті випробування. Як головний вчений, відповідальний виконавець повинен взаємодіяти з іншими ключовими науковими співробітниками, бути інформованим про отримані результати в період випробування, приймати та оцінювати індивідуальні звіти для включення їх до заключного звіту про випробування.

Адміністративна функція відповідального виконавця полягає у забезпеченні та координації ресурсів для випробування, таких як персонал, устаткування, засоби випробування, а також у забезпеченні їх доступності й адекватності для належного проведення випробування.

Дотримання відповідності законодавчим актам також лежить на відповідальному виконавцеві. Він відповідає за відповідність процесу випробування принципам GLP, що підтверджується підписом відповідального виконавця у заключному звіті.

Керівник установи (лабораторії) є відповідальним за дотримання принципів GLP. Його обов'язками є призначення та ефективна організація належної кількості кваліфікованих і досвідчених робітників (штат лабораторії), включаючи відповідальних виконавців. Установа

## Обов'язки керівника установи

Керівник установи повинен забезпечити проведення випробування відповідно до принципів GLP. Це включає:

- 1) призначення особи (осіб), що виконують управлінські функції в лабораторіях відповідно до принципів GLP;
- 2) забезпечення випробування достатньою кількістю кваліфікованого персоналу, відповідними засобами, обладнанням та матеріалами, необхідними для своєчасного та адекватного проведення випробування;
- 3) забезпечення реєстрації даних про кваліфікацію, освіту, досвід кожного працівника, а також наявності посадових інструкцій;
- 4) забезпечення ясного розуміння персоналом функцій, які він повинен виконувати, а в разі потреби проведення відповідного навчання;
- 5) забезпечення наявності та виконання відповідних СОП, а також затвердження оригінальних та удосконалених СОП;
- 6) забезпечення наявності програми контролю якості та відповідного персоналу служби контролю якості, обов'язки якої сформульовані згідно вимог GLP;
- 7) призначення до початку випробування відповідального виконавця кожного випробування, який має відповідну кваліфікацію, освіту та досвід. Заміна відповідального виконавця повинна проводитись у встановленому порядку;
- 8) у випадку багатоцентричних випробувань, забезпечення, в разі необхідності, наявності головного дослідника, який має відповідну кваліфікацію, освіту та досвід для успішного проведення фази випробування, що делегується. Заміна головного дослідника повинна документуватись і провадитись у встановленому порядку;
- 9) забезпечення затвердження протоколу випробування відповідальним виконавцем випробування;
- 10) ознайомлення служби контролю якості із затвердженим протоколом;
- 11) забезпечення ведення історичного файлу за всіма СОП;
- 12) призначення особи, відповідальної за керування архівом;
- 13) забезпечення відповідності робіт згідно головного графіка випробувань;
- 14) забезпечення відповідності тест-систем вимогам, що висуваються до відповідних випробувань;
- 15) у випадку багатоцентричних випробувань, забезпечення надійного зв'язку та взаємодії між відповідальним виконавцем, головним дослідником, персоналом випробування та службою контролю якості;
- 16) забезпечення наявності відповідних характеристик досліджуваних та контрольних зразків, а також зразків порівняння;
- 17) забезпечення відповідності комп'ютеризованих систем меті випробування, а також відповідності їхньої роботи й обслуговування принципам GLP;

Якщо фаза(и) випробування проводяться в декількох місцях, Управління окремим випробуванням (якщо таке є) має обов'язки, які визначені вище в пунктах: 7, 9, 10 та 15.

(лабораторія), яка проводить випробування, повинна мати керівний документ, яким визначено процедуру відбору і призначення відповідальних виконавців та їх заступників відповідно до вимог національних програм.

При призначенні відповідального виконавця керівник установи (лабораторії) повинен чітко визначати поточні та майбутні обсяги його роботи. Керівні плани, що містять інформацію про вид і терміни випробувань для кожного відповідального виконавця, повинні складатися індивідуально в межах кожної установи. За наявності декількох місць розташування випробувань такі документи є важливими інструментами управління.

Керівник установи (лабораторії) повинен забезпечувати наявність необхідної документації для навчання щодо всіх аспектів роботи відповідального виконавця. Програма навчання має сприяти чіткому розумінню відповідальними виконавцями принципів GLP, а також достатнє знання експериментальних лабораторних методів. У план навчання можуть бути включені й інші керівні документи та законодавчі акти, що мають відношення до діяльності лабораторій. Навчання може включати і набуття досвіду роботи під наглядом компетентних спеціалістів.

## Обов'язки відповідального виконавця

Відповідальний виконавець зобов'язаний:

- 1) підтверджувати протокол випробування та будь-які поправки до протоколу випробування датованим підписом;
- 2) забезпечити наявність у службі контролю якості без затримок у часі копії протоколу з усіма поправками. Протягом проведення випробування ефективно взаємодіяти з цією службою, наскільки це необхідно;
- 3) забезпечити доступність протоколу випробування з поправками та СОП персоналу, зайнятому в дослідженні;
- 4) забезпечити, щоб у випадку багатоцентрових випробувань протокол випробування та звіт про випробування чітко визначали ролі всіх головних дослідників, а також усіх тест-систем та місць випробування, включених у випробування;
- 5) забезпечити проведення відповідно до протоколу випробувань операцій, передбачених протоколом, оцінювати та документувати вплив будь-яких відхилень від протоколу випробувань на якість та цілісність випробування, в разі необхідності активно вносити необхідні корективи, контролювати відхилення від СОП;
- 6) забезпечити повне документування та запис всіх отриманих ключових даних;
- 7) забезпечити адекватність роботи комп'ютеризованих систем, використаних у випробуванні;
- 8) підписувати і датувати звіт про випробування, приймаючи на себе відповідальність за достовірність наданих даних, а також визначати ступінь відповідності проведених випробувань вимогам GLP;
- 9) забезпечити, щоб після закінчення (включаючи і припинення) випробування протокол випробування, звіт про випробування, ключові дані та підтримуючі матеріали були архівовані.

Наявність робочого досвіду в рамках кожної дисципліни, задіяної у випробуванні, допоможе забезпечити глибоке розуміння відповідних практичних аспектів і наукових принципів випробування, а також буде сприяти формуванню ланцюгів взаємодії. Участь у внутрішніх та візних семінарах і курсах, членство у фахових товариствах та ознайомлення з потрібною літературою дозволить відповідальним виконавцям забезпечити належний рівень знань у їх наукових областях. Фахове вдосконалення повинно бути безупинним і піддаватися періодичним оглядам. Стадії навчання повинні бути відповідним чином документовані із зберіганням записів на період, встановлений відповідними службами.

Документовані записи програми навчання мають відбивати послідовність навчання і забезпечувати чітке визначення області знань, яку освоює кожна конкретна особа. З часом може знадобитися додаткове навчання або перенавчання, наприклад, для освоєння нових технологій, методів або законодавчих вимог.

Відповідальний виконавець є особою, яка несе повну відповідальність за наукове проведення випробування і підтвердження відповідності випробування принципам GLP, затвердженим ОЕСР.

Відповідальний виконавець повинен затвердити підготовлений протокол випробування до його початку. Цей документ повинен чітко визначати цілі, послідовність проведення випробування в цілому та необхідні засоби. Своім підписом у протоколі випробування із зазначенням дати він бере на себе відповідальність за випробування. При цьому протокол стає офіційним робочим документом для даного випробування. За необхідності, відповідальний виконавець повинен забезпечити письмове узгодження протоколу з адміністрацією і спонсором, якщо цього потребують національні програми. Перед початком випробування відповідальний виконавець має забезпечити одержання копій протоколу усіма відповідальними співробітниками, що беруть участь у випробуванні, у тому числі і персоналом служби контролю якості.

Перед початком будь-якої стадії випробування відповідальний виконавець повинен переконатися в тому, що адміністрація забезпечила необхідні ресурси для виконання випробування, а також наявність адекватних матеріалів та тест-систем.

Відповідальний виконавець відповідає за проведення випробування в цілому, дотримання всіх методів, наведених у протоколі випробування та повне документування всіх даних, отри-



маних під час випробування. Окремі спеціальні технічні обов'язки можуть бути делеговані компетентному штату, що повинно бути підтверджене документально.

Участь відповідального виконавця у процесі випробування передбачає контроль за процедурами проведення випробування, вживання заходів щодо забезпечення дотримання методів, передбачених протоколом випробування, забезпечення їх відповідності СОП, включаючи комп'ютерний збір інформації. Для підтвердження цього, вид і частота інспекцій повинні бути відображені в записах випробування.

Оскільки можуть виникнути ситуації, здатні вплинути на цілісність випробування, необхідно передбачити наявність затверджених відповідальним виконавцем засобів зв'язку, здатних забезпечити постійну його інформованість про стан випробування. Це особливо важливо у випадках, коли виникає потреба тимчасової відсутності відповідального виконавця. Необхідна поінформованість може бути досягнута використанням ефективних засобів зв'язку з усім персоналом, включеним в випробування, як науковим, так і технічним та адміністративним. Необхідно забезпечити швидку передачу інформації про будь-які зміни в протоколі випробування, причому всі питання, що піднімаються, повинні документуватися.

Якщо дані реєструються на папері, відповідальний виконавець повинен забезпечити повне й акуратне їх документування, а також відповідність способу їх одержання принципам GLP. При електронній реєстрації даних за допомогою автоматизованих систем обов'язки відповідального виконавця такі ж, що й при реєстрації даних на паперовому носії. Крім того, відповідальний виконавець повинен забезпечити достовірність роботи комп'ютеризованої системи та придатність її для використання у випробуваннях.

Заключний звіт випробувань повинен бути представлений, як докладний науковий документ, у якому визначено мету, описано методи та використані матеріали, викладено та проаналізовано отримані дані, а також обґрунтовано висновки.

Якщо відповідальний виконавець вважає звіт закінченим, а виклад проведених випробувань та отриманих результатів достовірним і точним, він підписує і датує заключний звіт, беручи на себе відповідальність за достовірність даних і відповідність випробувань принципам GLP. Крім того, він повинен переконатися в наявності офіційного звіту про контроль якості та оцінку виявлених відхилень від протоколу випробувань.

Відповідальний виконавець є відповідальним за належну передачу до архіву протоколу випробувань, заключного звіту, вихідних даних та матеріалів стосовно даних випробувань. У заключному звіті повинно бути вказано місце зберігання зразків, вихідних даних, протоколу випробування, заключного звіту та іншої документації. Після передачі даних до архіву відповідальність за їх збереження перекладається на керівника Установи-виконавця.

У випадку, коли деякі етапи випробування виконуються на контрактній основі, відповідальний виконавець, а також персонал служби гарантії якості повинні бути поінформовані про відповідність Установи-підрядчика вимогам GLP. Відомості про відсутність такої відповідності мають бути наведені керівником випробування у заключному звіті.

Правки до протоколу випробувань мають бути внесені і документально підтверджені ще до початку досліджень, які повинні виконуватись з урахуванням вказаних змін. Правки можуть бути результатом неочікуваних обставин, виявлених під час випробувань, які вимагають прийняття невідкладних заходів. При цьому необхідно зазначити причину внесення кожної зміни, вказати її номер, дату, підпис і довести до відома всіх співробітників, яким надано початковий протокол випробування. Ці функції покладаються на керівника випробувань.

У той час, як правка є запланованою зміною протоколу випробування, відхилення являють собою незаплановану зміну, яка може виникнути під час виконання випробувань. Відхилення від протоколу випробувань повинно бути зафіксованим в документації з випробувань. Подібні записи можуть здійснюватися будь-якою особою, яка бере участь у випробуваннях, але вони обов'язково повинні бути затверджені відповідальним виконавцем, так само, як будь-яке інше коригування. Відповідальний виконавець визначас необхідність консультації з іншими

науковцями для визначення впливу даного відхилення на випробування. Він повинен зазначити (і, при необхідності обговорити) ці відхилення в заключному звіті.

Вимоги до кваліфікації відповідального виконавця визначаються для кожного окремого випробування і є обов'язком керівника установи, який відповідає за вибір та затвердження відповідального виконавця випробувань з метою забезпечення відповідності їх принципам GLP. Мінімальні вимоги до кваліфікації відповідального виконавця, визначені керівником установи, повинні бути зареєстровані у відповідних посадових інструкціях. На додаток до відповідної технічної підготовки, посада відповідального виконавця потребує від нього вміння спілкуватися, вирішувати проблеми та здатності до керівництва. Відповідальний виконавець несе повну відповідальність за їх виконання в цілому. Термін «повна відповідальність за проведення випробування в цілому та за звіт про нього» може бути інтерпретований у широкому значенні для тих випробувань, де їх керівник віддалений географічно від місця проведення експериментів. При наявності багатоступеневих рівнів управління, персоналу випробування і штату служби гарантії якості надзвичайно важливо встановити чіткі лінії керівництва і засоби зв'язку для забезпечення належних умов для ефективного виконання відповідальним виконавцем своїх функцій відповідно до вимог GLP. Це повинно бути задокументовано у письмовому вигляді.

Для ділянок випробувань, де відповідальність делеговано головному дослідникові, відповідальний виконавець доручас відповідальній особі забезпечення відповідності фаз випробування до протоколу, СОП, а також принципів GLP. Про випадки виникнення ситуацій, здатних вплинути на виконання досліджень, визначених протоколом випробувань головний дослідник зобов'язаний інформувати відповідального виконавця. Ці доповіді повинні бути задокументовані.

Необхідно забезпечити взаємодію між відповідальним виконавцем та службою контролю якості на всіх етапах досліджень.

Така взаємодія може включати:

- активне співробітництво зі службою гарантії якості, наприклад, при перевірці протоколів випробувань, впровадження нових та перегляд вже існуючих СОП, присутність співробітника служби контролю якості на зборах перед початком випробувань, а також рішення потенційних проблем щодо GLP;

- негайне реагування на звіти інспекційних перевірок лабораторій та досліджень, співробітництво, у разі потреби, із персоналом служб контролю якості, а також науковим і технічним персоналом з метою оперативного усунення невідповідностей, виявлених аудиторськими та інспекційними перевірками.

Відповідальний виконавець відповідає за їх проведення в цілому згідно принципів GLP, сумлінне виконання протоколу випробувань та забезпечення документальної реєстрації усіх спостережень. Теоретично, усі ці вимоги здійсненні у випадку постійної присутності відповідального виконавця протягом усього періоду їх проведення. Проте це не завжди можливо на практиці, тому в період відсутності відповідального виконавця повинна бути передбачена його заміна. Оскільки обставини, за яких відповідальний виконавець має бути заміщений, не визначені принципами GLP, вони повинні бути обумовлені в СОП, які б включали процедури і документацію, необхідні для заміщення відповідального виконавця.

Рішення про заміщення або тимчасове делегування повноважень відповідального виконавця приймається керівником установи (лабораторії). Всі подібні рішення повинні бути задокументовані в письмовій формі. Існує дві обставини, за яких розглядається можливість заміщення відповідального виконавця, причому обидві вони стосуються лише довгострокових досліджень, оскільки при короткострокових передбачається постійна присутність відповідального виконавця.

Після закінчення терміну контракту відповідального виконавця необхідність його заміни очевидна. У цьому випадку одним з його обов'язків разом із персоналом служби контролю якості є гарантування відповідності керованого ним випробування встановленим критеріям. Факт заміщення відповідального виконавця і причини цього повинні бути задокументовані і

затверджені керівником установи (лабораторії). У випадку виявлення в ході перевірок відповідності роботи лабораторії принципам GLP будь-яких порушень під час функціонування тимчасово виконуючих обов'язки відповідального виконавця рекомендується їх документувати.

Друга обставина – тимчасова відсутність відповідального виконавця у зв'язку з відпусткою, науковим відрядженням, через хворобу або в разі нещасного випадку. Відсутність протягом короткого періоду не обов'язково потребує формального заміщення відповідального виконавця, у разі можливості зв'язатися з ним для вирішення проблем що виникають. Якщо передбачається, що критичні фази випробування співпадуть з періодом відсутності відповідального виконавця, вони можуть бути зсунені на більш зручний час (з внесенням, при необхідності, відповідних правок до протоколу випробувань). Крім того, за цих умов тимчасово може призначатись відповідальний виконавець або здійснюватись делегування його обов'язків компетентній особі. За відсутності відповідального виконавця протягом тривалого часу, рекомендується заміщувати керівника, а не делегувати його повноваження компетентній особі.

Повернення відповідального виконавця повинно здійснюватись, по можливості, швидко, незалежно від наявності зареєстрованих відхилень від принципів GLP та формального заміщення його на період відсутності. Відхилення від принципів GLP, зареєстровані за відсутності відповідального виконавця, повинні бути задокументовані при його поверненні.

Відповідальний виконавець, підписуючи заключний звіт, бере на себе відповідальність за виконання випробувань з дотриманням принципів GLP, а також точність надання отриманих даних. Проте юридична відповідальність відповідального виконавця встановлюється національним законодавством і юридичними процедурами, а не принципами GLP, затвердженими ОЕСР.

**Обов'язки головного дослідника.** При багатоцентричних випробуваннях реально забезпечити на всіх ділянках пряме вичерпне управління відповідальним виконавцем. У цьому випадку на кожному ділянці випробувань доцільно призначати головного дослідника, територіально відокремленого від відповідального виконавця. Головний дослідник – особа, яка має відповідну кваліфікацію і здатна ефективно проводити технічну фазу випробувань відповідно до протоколу, СОП, принципів GLP і спеціальних технічних вимог. Слід зазначити, що відповідальний виконавець лише делегує головному дослідникові обов'язки, в той час як відповідальність відповідального виконавця не може делегуватись.

Не варто призначати головного дослідника на місці географічного та адміністративного розташування відповідального виконавця. Головний дослідник повинен датованим підписом висловити згоду з протоколом випробувань, а також із будь-якими доповненнями до нього. В разі потреби повинні бути забезпечені також датовані підписи керівника установи та замовника. У випадку, коли головний дослідник одночасно зайнятий у випробуванні як спеціаліст, він може, консультуючись із відповідальним виконавцем, готувати правки до протоколу. Проте лише відповідальний виконавець відповідає за облік, затвердження і внесення правок до протоколу. З усіма правками до протоколу повинні бути ознайомлені всі виконавці, які одержали початковий варіант протоколу.

Головний дослідник відповідає за інформування служби гарантії якості про хід випробування в тій частині, в якій це її стосується. Базуючись на цій інформації персонал служби складає графік інспекцій. Головний дослідник повинен негайно реагувати на доповіді служби гарантії якості.

Після закінчення випробування головний дослідник повинен підписати і датувати фрагмент звіту, засвідчуючи, що в ньому точно відображено проведені дослідження та отримані результати. У цей звіт повинна бути включена достатня кількість коментарів, які дадуть можливість відповідальному виконавцю написати звіт про випробування. Головний дослідник повинен письмово засвідчити у фрагменті звіту підтвердження відповідності випробувань правилам GLP або чітко позначити моменти відхилення від цих правил.

Якщо документи і матеріали випробування були архівовані локально, у частковому звіті повинно бути зазначено місце знаходження цього архіву.

**Обов'язки персоналу** (табл. 1В). Весь персонал, залучений до випробування, повинен бути ознайомлений з тими аспектами принципів GLP, які стосуються їхньої безпосередньої діяльності. Слід впевнитися в тому, що персонал адекватно володіє обов'язками, які він буде виконувати.

Персонал випробування повинен мати безпосередній доступ до протоколу випробування і відповідних СОП. Виконання інструкцій, що містяться в цих документах, є обов'язковим для персоналу. Будь-які відхилення від них повинні бути задокументовані, а інформація доведена до відома відповідального виконавця та/або головного дослідника.

Персонал випробування відповідає за правильність та акуратність реєстрації даних і їх відповідність принципам GLP, а також за якість цих даних.

Слід передбачити наявність необхідного персоналу для забезпечення техніки безпеки, який був би зобов'язаний перешкоджати забрудненню тест-систем та досліджуваних зразків, а також контролювати дотримання адекватних запобіжних заходів при роботі з відомими, невідомими або небезпечними матеріалами.

Співробітники повинні дотримуватися техніки безпеки на робочому місці. З хімічними речовинами слід поводитися з належною обережністю, доки ступінь їхньої небезпечності не буде встановлено.

Співробітники повинні дотримуватись запобіжних заходів для зменшення ризику для них самих та дотримання цілісності випробування.

Якщо стан співробітників може несприятливо впливати на випробування, їх варто звільнити від виконання фрагментів, здатних вплинути на хід випробування.

Відповідно до вимог GLP керівник установи, яка проводить випробування, повинен забезпечити реєстрацію даних про кваліфікацію, освіту, досвід кожного працівника, а також наявність посадових інструкцій. Крім того, необхідно забезпечити чітке розуміння персоналом функцій, які він повинен виконувати, а в разі потреби, провести відповідне навчання. Зазвичай відомості про кваліфікацію, освіту, досвід і послужний список надаються у вигляді автобіографії.

Посадові інструкції повинні відповідати правилам GLP, тобто вони повинні містити найменування роботи, необхідний досвід і кваліфікацію для її виконання, а також перелік основних процедур, особливо тих, які входять до компетенції GLP. Посадові інструкції повинні бути підписані співробітником і керівником.

Документ про навчання, як правило, створюється у формі переліку процедур, які співробітник може виконувати самостійно після навчання. Він вважається ключовим документом GLP, оскільки відбиває процедури, виконання яких гарантується даним робітником. Одним із методів, який може бути використано керівником установи, відповідальним виконавцем або службою гарантії якості для визначення придатності співробітника для виконання даної процедури, є вивчення документів про його навчання.

Необхідно передбачити можливість перенавчання у зв'язку, наприклад, із тривалою відсутністю співробітника або технічними змінами операції.

Таблиця 1В

### **Обов'язки персоналу випробування**

Персонал випробування має такі обов'язки:

- 1) персонал, який бере участь у дослідженні, повинен бути ознайомлений із принципами GLP у ступені, що стосується його участі в дослідженні;
- 2) персонал випробування повинен мати доступ до протоколу випробування та СОП у ступені, що має відношення до його участі в дослідженні. Обов'язок персоналу включає дотримання інструкцій, викладених у цих документах. Всі відхилення від цих документів повинні бути задокументовані, а відомості про них надані відповідальному виконавцю та/або головному досліднику;
- 3) персонал випробування відповідає за вірну й акуратну реєстрацію даних та їх відповідність до принципів GLP, а також за якість цих даних;
- 4) персонал випробування повинен додержуватись вимог техніки безпеки. Працівники повинні повідомляти про стан здоров'я відповідній особі, а в несприятливих випадках їх не варто залучати для виконання операцій, суттєвих для виконання випробування.

Опис ведення записів про навчання повинен міститися в СОП, де має зазначатися, хто повинен мати записи про навчання і хто їх санкціонує. Згідно з принципами GLP, записи про навчання передбачаються для всіх категорій персоналу, включаючи й відповідального виконавця. У СОП повинно бути визначено, де фіксуються записи про навчання, а також відзначено, що ці записи направляються до архіву у випадку, якщо подальша діяльність робітника виходить за межі компетенції GLP. У СОП також зазначається необхідність документування відвідування робітником курсів і конференцій.

У деяких випадках, зокрема для досвідченого персоналу, можливе самостійне навчання. Доцільність і можливість самонавчання повинні визначатися керівником установи.

**Організаційна карта.** Повинна бути сформована організаційна карта випробування, у якій вказуються головні відповідальні виконавці, відповідальні за дотримання правил GLP, а також визначаються основні лінії зв'язку і звітності між установами, які проводять випробування. Карта повинна відбивати основні області робіт, що стосуються GLP, крім того в ній повинні бути зазначені особи, які несуть відповідальність перед регламентуючими органами GLP. Карта повинна включати список осіб, які можуть бути призначені відповідальним виконавцем і головним дослідником (при необхідності). Доцільно також включити в карту відомості про керівника лабораторії, контролера досліджуваних препаратів, адміністратора СОП, архіваріуса та персонал служби гарантії якості. Організаційна карта, список відповідальних виконавців і головних дослідників повинні передаватися до архіву.

**Служба контролю якості.** Принципи GLP, які стосуються служби контролю якості, подані в табл. 2. Заснування й ефективна діяльність програми гарантії якості є вимогою GLP і одним

Таблиця 2

### Програма контролю якості

<b>2.1 Загальні питання</b>
1. Досліджувані засоби повинні мати документовану програму контролю якості для забезпечення приведення випробування у відповідності до принципів GLP
2. Програма контролю якості повинна провадитись особою або особами, призначеними адміністрацією (які також несуть пряму відповідальність перед нею) та добре знайомими з процедурами випробування
3. Такі особи не повинні включатися в проведення випробування, яке вони контролюють
<b>2.2 Обов'язки персоналу служби контролю якості</b>
1. Обов'язки персоналу служби контролю якості включають, але не обмежуються, наступними функціями. Він зобов'язаний:
1) мати в наявності копії всіх протоколів випробувань та СОП, що використовуються засобами тестування, а також мати доступ до поточного головного графіка робіт;
2) підтверджувати, що протокол випробувань містить всю інформацію, яка необхідна для його відповідності принципам GLP. Це підтвердження повинно бути документоване;
3) проводити інспекції з метою визначення відповідності проведених випробувань до принципів GLP. Інспекції повинні також підтверджувати, що протокол випробування та відповідні СОП доступні для персоналу випробування, і що персонал дотримується цих документів. Інспекції можуть бути трьох типів, як встановлено в СОП програми контролю якості:
i) інспекція випробувань
ii) інспекція тест-систем
iii) інспекція процесів випробування
4) інспектувати <b>звіт</b> про випробування для підтвердження того, що методи, процедури і спостереження описані точно та цілком, а надані результати точно та цілком відображають дані, отримані в результаті випробування;
5) доповідати результати інспекції в письмовому вигляді відповідальному виконавцю, головному досліднику, а також відповідній адміністрації в разі необхідності;
6) готувати та підписувати висновок, що вноситься в <b>звіт</b> про випробування і який містить відомості про тип інспекцій, їхні дати, а також дати надання доповідей про результати інспекцій адміністрації, відповідальному виконавцю та головному досліднику. Цей висновок повинен також служити підтвердженням того, що <b>звіт</b> про випробування відображає отримані в процесі випробування результати.

з принципових заходів, що забезпечує статус відповідності випробування GLP вимогам щодо персоналу випробування, управління, замовників і, врешті-решт, регулюючих повноважень. Функції служби контролю якості ґрунтуються швидше на організаційних, а не на наукових процедурах. Таким чином, діяльність служби контролю якості не перетинається з технічними і науковими аспектами проведення випробувань.

Керівник установи несе максимальну відповідальність за дотримання принципам GLP, включаючи призначення та ефективну організацію служби контролю якості. Особи, зайняті в цій службі, повинні бути незалежними від випробувань, що інспектуються. Вони повинні надавати звіти тому рівню адміністрації, який несе загальну відповідальність за дотримання принципів GLP. У невеликих установах може виявитися недоцільним утримання постійно діючого персоналу служби контролю якості. Проте й у цьому випадку адміністрація повинна призначити щонайменше одну особу, яка має постійні, хоча і періодично використовувані, повноваження з контролю якості. Крім того, адміністрація може наймати персонал служби контролю якості за контрактом, не маючи таким чином подібної структури всередині випробування.

Інспекції служби контролю якості охоплюють і методи, забезпечуючи їхню відповідність протоколу випробувань, СОП і принципам GLP. Вони повинні приділяти увагу перевірці потоків інформації, засобів збереження зразків і передачу даних. Це особливо важливо для багаточасових випробувань, коли необхідно координувати міжлабораторну діяльність служби контролю якості, забезпечуючи контроль всіх критичних фаз. Якщо до випробування залучається лабораторія, яка не належить до компетенції національної програми відповідності GLP, але бере участь у випробуваннях за принципом GLP, то для неї необхідно передбачити підвищений моніторинг з контролю за якістю.

Результатом інспекцій установ, процедур і звіту про випробування є доповідь служби контролю якості, яка направляється у відповідальні інстанції, включаючи відповідального виконавця та керівника установи. Ця доповідь повинна розглядатися, як засіб посилення дотримання вимог GLP. Для отримання доповіді необхідно встановити терміни, протягом яких вони повинні підреагувати на цей документ, наприклад, два тижні. У доповіді повинні зазначатися істотні факти порушення, а розгляд поданого матеріалу повинен проводитися якомога оперативніше.

Персонал служби контролю якості повинен підготувати і підписати висновок, який буде включено до звіту про випробування. У цьому висновку має міститися інформація про типи інспекцій, дати їх проведення, вказано дати доповідей про встановлені факти порушень. Цей висновок також є підтвердженням, що звіт про випробування відбиває отримані первинні дані. Висновок служби контролю якості зазвичай є окремим документом, який додається до звіту про випробування, що свідчить про незалежність служби контролю якості.

Лабораторія, яка проводить випробування, повинна мати затверджену програму контролю за якістю для гарантії того, що проведені випробування було виконано згідно з принципами GLP. Програма контролю якості повинна виконуватися особою або особами, знайомими з процедурами випробувань. Вони призначаються і підпорядковуються безпосередньо відповідальному виконавцю.

Така особа (особи) не повинні брати участь у випробуваннях, якіть яких контролюється, і звітувати про виявлені ними факти порушень у письмовій формі безпосередньо адміністрації і керівнику випробування.

Обов'язки персоналу контролю якості включають, але не обмежуються наступними функціями:

- засвідчувати, що протокол випробування та СОП доступні персоналу, який проводить випробування;

- забезпечувати перевірку протоколу випробування та СОП в ході періодичних інспекцій лабораторії, яка проводить випробування, та/або при перевірці випробувань у процесі його проведення. Записи про такі процедури повинні зберігатися;

- негайно повідомляти керівництво установи та відповідального виконавця про незатверджені (неузгоджені) відхилення від протоколу та СОП;

- переглядати заключні звіти для підтвердження того, що методи, процедури і спостереження описані повністю, а запроTOCOLьовані результати точно відбивають вихідні дані випробування;
- готувати та підписувати висновок, необхідний для включення до заключного звіту, в якому вказуються дати проведених інспекцій і дати повідомлення керівництва і відповідального виконавця про будь-які недоліки та порушення.

**Розміщення випробування.** Плани лабораторій є важливими документами, оскільки вони демонструють якість організації лабораторії і ступінь адекватності поділу функцій та діяльності. План лабораторії, на відміну від інженерного плану, може бути не дуже детальним, проте він повинен бути датований і відбивати головні функціональні площі, такі як приміщення для зберігання зразків, що випробовують, робочі місця та архіви. Плани лабораторій повинні бути передані до архіву.

Лабораторія, яка проводить випробування, повинна мати відповідні розміри, конструкцію та розташування, які б відповідали вимогам випробування і сприяли зведенню до мінімуму порушень (перешкод), здатних несприятливо вплинути на достовірність результатів.

Конструкція експериментальної лабораторії повинна забезпечувати належний ступінь розподілу різноманітних видів діяльності для гарантування належного проведення кожного виду випробувань.

**Приміщення для тест-систем.** Принципи GLP стосовно установ, які виконують випробування наведено в табл. 3. Основні вимоги до установ визначаються типом тест-систем, що використовуються, та видом випробувань, що проводяться. Вони мають включати усі будинки, кімнати й устаткування. Необхідно забезпечити початковий карантин, діагноз/лікування захворювань, зберігання досліджуваних препаратів до і після їх експозиції, а також ізоляцію від зовнішнього впливу. Останній може бути у формі забруднень іншими тест-системами (через зразки), у вигляді пилу при підготовці проб, що випробовують, або препаратів порівняння. Кожний тип тест-системи повинен бути цілком незалежним один від одного.

На початку впровадження GLP під засобами випробувань мались на увазі кімнати або їх частини, оскільки вони були наявні у більшості випробувань *in vivo*, де тест-системи піддавалися впливу кімнатного повітря, тому моделювання умов довкілля відбувалося саме на цьому рівні. На протигагу цьому, більшість випробувань *in vitro* (особливо культури клітин та органів) проводяться в закритих вертикальних ламінарних біологічно захищених шафах, які захищають як тест-системи, так і оператора. Тест-системи розміщують усередині інкубатора, що забезпечує системі дотримання необхідних параметрів навколишнього середовища. Різні культури відокремлені одна від одної, оскільки вони розташовані в різних флаконах, трубках, чашках, де вони ростуть та досліджуються. Таким чином, виникає необхідність уточнення формулювань принципів GLP для випробувань *in vitro*. Для прояснення ситуації необхідне введення терміну «або устаткування» щодо формулювання вимог до засобів тестування.

У лабораторії, що проводить випробування, повинна бути достатня кількість кімнат або площ для забезпечення ізоляції тест-систем та окремих проєктів, у яких використовуються субстанції, що можуть бути біологічно небезпечними.

Для діагностики, лікування і контролю за перебігом захворювання необхідні відповідні приміщення, які б гарантували відсутність неприємного ступеня ушкодження тест-систем.

**Необхідні приміщення для зберігання матеріалів та устаткування.** Склади мають бути відділені від площ, на яких розміщені тест-системи, і відповідним чином охоронятися від інвазій, зараження та забруднення. Варто забезпечити заморожування продуктів, що швидко псуються.

**Приміщення для підготовки речовин, що випробовуються, та препаратів порівняння.** Операції із зразками, що випробовуються, і препаратами порівняння у випробуваннях *in vitro* зазвичай здійснюються на герметичному устаткуванні, яке захищає як зразки, так і оператора. Об'єми зразків, що готуються, у цьому випадку достатньо малі порівняно з об'єктами, які використовуються для випробувань *in vivo*. У матеріалах, наведених у табл. 3, особливий наголос робиться на необхідності забезпечення відсутності забруднень і змішування, що обумов-

## Тест-системи

<b>3.1 Загальні питання</b>
1. Тест-системи повинні бути відповідного розміру, конструкції та розташування, щоб відповідати вимогам, які висуваються до випробування, а також для мінімізації відхилень, що можуть уплинути на достовірність випробування.
2. Конструкція тест-систем повинна забезпечити адекватний ступінь поділу різноманітних операцій для забезпечення вірного проведення кожного випробування.
<b>3.2 Характеристика тест-систем</b>
1. Тест-системи повинні включати достатню кількість кімнат, площ <b>або відповідного обладнання (наприклад, біологічно захищених шаф)</b> для забезпечення ізоляції тест-систем, а також індивідуальних об'єктів, включаючи речовини й організми, ідентифікованих (або попередньо очікуваних), як небезпечні
2. Відповідні кімнати, площі <b>або обладнання (наприклад, біологічно захищені шафи)</b> повинні бути легко доступні для обробки та культивування тест-систем <i>in vitro</i> , забезпечуючи при цьому відсутність забруднень тест-систем.
3. Необхідно виділити кімнати для збереження обладнання витратних матеріалів, що поставляються. Такі кімнати, площі <b>або обладнання</b> повинні бути відділені від кімнат, площ <b>або обладнання</b> , у яких розташовані тест-системи. У них повинен передбачатись діючий захист від зараження, забруднень та/або ушкоджень
4. <b>Тест-системи повинні передбачати адекватне обладнання (наприклад біозахисні шапочки, витяжні шафи) для захисту персоналу випробування, навколишнього середовища і тест-систем.</b>
<b>3.3 Правила для роботи з досліджуваними, контрольними зразками та зразками порівняння</b>
1. Для запобігання забруднення або перемішування, повинні бути передбачені окремі кімнати, площі або <b>шафи</b> для одержання та зберігання досліджуваних, <b>контрольних зразків та зразків порівняння. Змішування досліджуваних, контрольних зразків та зразків порівняння з розчинником повинно проводитись так, щоб уникнути забруднення або взаємного перемішування.</b>
2. Кімнати, площі або <b>шафи</b> , призначені для збереження досліджуваних, <b>контрольних зразків та зразків порівняння</b> , повинні бути відділені від кімнат, площ або <b>обладнання для збереження, де знаходяться</b> тест-системи. Ці засоби повинні бути організовані належним чином для адекватної підтримки ідентифікації, концентрації, чистоти та стабільності матеріалу, що зберігається, а також для безпечного зберігання небезпечних препаратів.
<b>3.4 Засоби архівування</b>
Засоби архівування повинні забезпечити безпечне збереження та пошук протоколів випробувань, оригінальних даних, <b>звітів</b> про випробування, проб об'єктів випробування та зразків. Конструкція архіву й умови збереження повинні забезпечити захист вмісту архіву від передчасного погіршення якості.
<b>3.5 Розміщення відходів</b>
Утилізація та розміщення відходів повинні провадитись таким чином, щоб не наражати на небезпеку цілісність випробування. Необхідно забезпечити наявність відповідних засобів накопичення, збереження та розміщення відходів, а також технологій знезараження і транспортування.

лено особливостями засобів, які застосовуються у випробуваннях *in vitro*, та обсягами використуваних матеріалів.

З метою запобігання забрудненню або змішуванню необхідно передбачити окремі приміщення для прийому та зберігання субстанцій, що випробовуються, і препаратів порівняння, а також змішування їх із наповнювачем.

Повинні існувати адекватні умови для зберігання матеріалів, що постачаються, і устаткування (наприклад, рефрижератори, морозильні камери, витяжні шафи, складські кімнати). Вони повинні бути належним чином відділені від тест-систем і забезпечувати їх захист від зараження, забруднення та/або пошкоджень.



Склади для зберігання речовин, що досліджуються, повинні бути відділені від площ, на яких розміщені тест-системи, і бути придатними для підтримки ідентичності, концентрації, чистоти та стабільності, а також забезпечувати безпечне зберігання небезпечних речовин.

Дослідження, що відповідають вимогам GLP, а також не регламентуються цими правилами, можуть проводитись одночасно в одному приміщенні. За цих умов адміністрація повинна встановити чітку політику і процедури, необхідні для забезпечення виконання «регульованих» випробувань щодо правил GLP при супутньому проведенні «нерегульованих» експериментів, встановивши деякий базовий рівень відповідності GLP з метою забезпечення проведення лабораторним персоналом основних процедур відповідно з вимогами GLP (наприклад, зважування, маркірування і калібрування).

Персонал не повинен починати будь-яку діяльність на відповідних принципах GLP площах лоти, поки він не пройде необхідне навчання вимогам GLP. Наявність діяльності, що відповідає і не відповідає GLP, потребує постійної пильної уваги з боку керівника установи, відповідального виконавця, контролерів і персоналу служби контролю якості з метою забезпечення безупинної відповідності процесу випробування вимогам GLP.

Дослідження, які проводяться з дотриманням або без дотримання принципів GLP, не повинні відрізнятися. Наприклад, клітинна культура, що використовується при проведенні випробувань, які не вимагають регулювання стосовно GLP, але виконуються в атестованих інкубаторах, повинна мати те саме маркірування і недоступність для випадкових впливів, що й за умов експерименту згідно правил GLP.

**Архіви.** Необхідно передбачити наявність архіву для зберігання та пошуку вихідних даних, звітів, зразків і проб.

**Утилізація відходів.** Обробка й утилізація відходів повинні здійснюватися таким чином, щоб не наражати на небезпеку цілісність випробувань, що проводяться.

Обробка й утилізація відходів, що утворилися в процесі виконання випробування, повинні здійснюватися згідно з відповідними регламентуючими вимогами. Необхідно передбачити приміщення для збирання, зберігання й утилізації, процедури дезактивації і транспортування, а також порядок ведення та зберігання записів, що мають відношення до попередніх дій.

**Прилади та апаратура.** Принципи GLP стосовно даної області наведено в табл. 4. Процедури перевірки, очищення, обслуговування та калібрування повинні бути узгоджені з протоколом випробування і відповідними СОП. Цей факт повинен бути документований у статусі вихідних даних.

До апаратури, що використовується для ізоляції тест-систем і створення належного довкілля, висуваються надзвичайно жорсткі вимоги при випробуваннях *in vitro*. Наприклад, у про-

Таблиця 4

*Апаратура, матеріали та реагенти*

1. Апаратура, включаючи перевірені комп'ютеризовані системи, що використовуються для одержання, зберігання та діставання даних, а також для контролю чинників навколишнього середовища, істотних для випробування, повинна бути відповідної конструкції, адекватної потужності та відповідним чином розміщена.
2. Апаратура, що використовується у випробуванні, повинна періодично перевірятись, чиститись, обслуговуватись, проходити тестування <b>на відповідність робочих характеристик</b> та калібруватись відповідно до СОП. Повинна здійснюватися ресстрація цих процедур. Калібрування, де це необхідно, повинно проводитись відповідно до національних та міжнародних вимірювальних стандартів.
3. Апаратура та матеріали, що використовуються в дослідженні, не повинні несприятливим чином взаємодіяти з системою тестування
4. Хімічні речовини, реагенти та розчини повинні бути маркіровані із вказівкою ідентифікації (і концентрації в разі необхідності), терміну придатності й інструкцій зі зберігання. Крім того, повинна бути доступна інформація про джерело, дати виготовлення та стабільності. Термін придатності може бути збільшений на основі документованої оцінки або аналізу.

токолі випробувань передбачається допустимий діапазон температури всередині інкубатора. Останній має підтримувати температуру в цьому діапазоні та забезпечувати доступ для перевірки та ресстрації температури. Зазвичай потрібно підтримувати декілька параметрів із щоденним їх документуванням (температура, вологість, концентрація CO<sub>2</sub>), крім того, деякі параметри оцінюються і документуються періодично.

Якість апаратури повинна забезпечувати передбачуваний та встановлений рівень надійності і точності. Спеціальні вимоги до певних типів апаратури (наприклад, періодичність чищення і калібрування) можуть бути не однаковими для всіх лабораторій і систем аналізу. Адміністрація і відповідальний виконавець повинні визначити відповідні вимоги. Як мінімум, повинні виконуватися вимоги, зазначені в інструкції заводу-виробника, яких рекомендується додержуватися до розробки спеціальної програми перевірки/калібрування.

Тестування отриманих або модифікованих комп'ютерних систем на адекватність ресстрації даних, їх обробки та зберігання є складним завданням, що включає перевірку як апаратного, так і програмного забезпечення, і повинно проводитися і документуватися відповідно до вимог GLP. Перед початком використання комп'ютерних систем у випробуваннях, що виконуються з дотриманням принципів GLP, необхідно переконатися в їх придатності для виконання поставлених завдань, а також у наявності процедур обслуговування і контролю системи. Повинна бути визначена область вихідних даних, які надходять до даної системи, а конструкція системи повинна забезпечувати проведення повних інспекторських перевірок усіх змін даних, а також підтвердження того, що ці зміни не вплинули на первинні дані. До початку випробування необхідно чітко визначити осіб, відповідальних за комп'ютерну систему.

Головна увага при тестуванні нових комп'ютерних систем повинна приділятися їх придатності до умов випробування, а не системи як такої. Необхідно перевірити, чи зможе комп'ютер із програмним забезпеченням одержувати бажаний результат при використанні жорстких тестів з відомою серією даних. Наприклад, для обробки даних, які одержували у процесі випробування, може бути зроблена електронна таблиця. У першу чергу необхідно перевірити і задокументувати її спроможність забезпечувати досягнення поставлених цілей, а не намагатися оцінити комерційний програмний продукт в цілому. При оцінці системи повинна здійснюватися перевірка всіх етапів перетворення даних, а також функції вибірки вихідного матеріалу. У цьому випадку необхідно точно визначити форму вихідних даних. Якщо вони рекомендуються у вигляді електронного файлу, відповідно до GLP стандартів, повинен забезпечуватися електронний підпис і датування цих даних.

Вимоги до апаратури і матеріалів, які використовуються у випробуванні, але безпосередньо не взаємодіють з тест-системами, також є визначальними при проведенні дослідів *in vitro*. При розробці протоколу випробувань, а також СОП щодо перевірки, очищення та дезінфекції варто приділяти увагу заходам запобігання наявності залишків хімічних препаратів, температурних флуктуацій або інших чинників навколишнього середовища, спроможних вплинути на тест-систему. Наприклад, варто звертати увагу на вплив яскравого сонячного світла на культуральне середовище або вібрацій інкубатора на однорідність клітинної культури.

Інструментальні засоби, які використовуються для ресстрації даних, контролю за впливом на оточуюче середовище, що має відношення до випробування, повинні бути зручно розташовані та мати відповідну конструкцію і потужність.

Інструментальні засоби, що використовуються у випробуванні, необхідно періодично перевіряти, чистити, обслуговувати і калібрувати у відповідності до СОП та зберігати про це записи.

**Матеріали.** Інструментальні засоби і матеріали, що використовуються у випробуваннях, не повинні справляти негативний вплив на тест-системи.

**Реактиви.** Реактиви повинні бути відповідно маркіровані із зазначенням джерела, ідентичності, інформації про концентрацію та стабільність. Маркірування повинно включати дату виготовлення, термін придатності, особливі вказівки щодо умов зберігання.

Маркірування хімічних сполук, реактивів і розчинів, включаючи готові середовища та реактиви, необхідно проводити відповідно до вимог GLP. У разі потреби допускаються зміни в маркіруванні, наприклад, додавання середовища з нестабільними компонентами може призвести до зміни терміну придатності.

**Тест-системи** (табл. 5). *Фізичні/хімічні тест-системи.* Інструментальні засоби (прилади), які використовуються для збору фізико-хімічних даних, повинні бути зручно розміщені, мати відповідну конструкцію та потужність.

Варто використовувати препарат порівняння при використанні фізико-хімічних тест-систем.

*Біологічні тест-системи.* Необхідно створювати та підтримувати належні умови для утримання, обробки та догляду за тваринами, рослинами, мікроорганізмами, а також іншими клітинними і субклітинними системами з метою забезпечення належної якості даних.

Крім того, умови повинні відповідати національним вимогам, які регламентують ввіз, збір, догляд та використання тварин, рослин, мікроорганізмів, а також інших клітинних і субклітинних систем.

Вперше отримані тест-системи тваринного і рослинного походження необхідно ізолювати до одержання результатів оцінки стану їх життєздатності. Якщо має місце незвична смертність або захворюваність, дана партія не повинна використовуватися у випробуваннях і, в разі потреби, повинна бути знищена з дотриманням гуманних методів.

Таблиця 5

*Тест-системи*

<b>5.1 Фізичні/хімічні</b>
1. Апаратура, що використовується для одержання фізичних/хімічних даних, повинна бути відповідним чином розміщена, мати належну конструкцію й адекватну потужність.
2. Повинна бути забезпечена повнота фізичних/хімічних тест-систем.
<b>5.2 Біологічні</b>
1. Повинні створюватись і підтримуватись необхідні умови для зберігання, розміщення, обслуговування та догляду за біологічними тест-системами, які забезпечують отримання якісних даних.
<b>2. Необхідно переконатись у відсутності забруднень або ушкоджень тест-системи. У випадку виявлення будь-яких ушкоджень або дефектів (наприклад, забруднень), ця система не може використовуватись у випробуваннях, а підлягає знищенню певним порядком. У момент початку випробування тест-система не повинна мати будь-яких ушкоджень або містити інші чинники, спроможні вплинути на хід випробування. Тест-система, забруднена або ушкоджена під час випробування, повинна бути відповідним чином знищена, щоб виключити її вплив на достовірність випробування.</b>
<b>3. Вихідні матеріали (наприклад, вид тварин і тканин), джерела, умови культивування і вимоги до догляду для тест-систем in vitro повинні бути документовані.</b>
4. Біологічні системи повинні акліматизуватись в умовах тестування протягом адекватного періоду часу перед тим, як почнеться введення/застосування досліджуваних матеріалів, <b>контрольних</b> матеріалів і матеріалів порівняння.
5. Вся інформація, необхідна для вірної ідентифікації тест-системи, повинна знаходитися в місці розташування контейнерів. У випадку переміщення індивідуальної системи з місця її розташування або контейнера під час проведення випробування, необхідно відповідним чином відмітити цю систему всіма можливими засобами.
6. У процесі використання місця розташування або контейнери для тестових систем повинні чиститися та піддаватися санітарній обробці через визначені інтервали часу. Будь-які матеріали, що знаходяться в контакті з тестовою системою, не повинні бути забруднені, причому ступінь чистоти повинен забезпечити відсутність небажаних впливів на випробування. <u>Підстилки для тварин повинні змінюватись відповідно до правил догляду за тваринами. Використання засобів боротьби з паразитами повинно документуватись.</u>
7. <u>При випробуваннях у польових умовах, тест-системи повинні розташовуватись таким чином, щоб уникнути впливу на них аерозольних потоків, що вишикають, наприклад, при розпиленні пестицидів.</u>

## Належна лабораторна практика (GLP)

Необхідно вести записи про джерело, дату надходження і умови їх надходження.

Тест-системи тваринного, рослинного, мікробного і клітинного походження повинні акліматизуватись до середовища, в якому буде проводитись випробування, протягом відповідного часу до початку досліджень.

Вся інформація, необхідна для належної ідентифікації тест-систем, повинна бути представлена на вольєрах або контейнерах, де їх мають розмістити.

Діагностика та лікування будь-якого захворювання до або під час проведення випробування повинна фіксуватися.

Особливості тест-систем, що використовуються при застосуванні альтернативних методів у токсикологічних випробуваннях, наведених далі.

**Речовини, що випробовуються, та препарати порівняння.** Принципи GLP, щодо цих речовин, наведено в табл. 6. Введено поняття «препарати порівняння», оскільки воно не співпадає з визначенням речовини порівняння. При використанні в моніторингу тест-системи, препарати порівняння не обов'язково порівнюються з досліджуваними таким же чином, як матеріали порівняння. Досить часто лише позитивні препарати порівняння класифікуються, як окремі речовини, в той час, як негативні можуть виступати в якості розчинника/посія препаратів, що випробовуються, позитивних препаратів порівняння та/або речовин порівняння.

Повинні бути визначені процедури, які б запобігали виникненню помилок щодо тотожності та перекресних забруднень речовин, що випробовуються, препаратів і речовин порівняння. Ці процедури можуть включати, наприклад, розділення площ для зберігання і розміщення препаратів порівняння, речовин, що досліджуються та порівнюються. З метою зменшення ризику забруднення та розкладу можуть додатково застосовуватися й інші процедури, нап-

Таблиця 6

### Досліджувані матеріали, контрольні матеріали та матеріали порівняння

<b>6.1 Одержання, розміщення, відбір та збереження</b>
1. Повинні вестись записи, що включають характеристику досліджуваних матеріалів, <b>контрольних</b> матеріалів та матеріалів порівняння, дату одержання, термін придатності, а також отриману і використану у випробуванні їхню кількість.
2. Повинні бути визначені процедури розміщення, відбору та збереження цих матеріалів для того, щоб забезпечити їхню однорідність та стабільність, а також запобігти можливим забрудненням і переміщенням.
3. Контейнери для збереження повинні містити інформацію з ідентифікації матеріалу, терміну придатності та спеціальні інструкції зі збереження.
<b>6.2 Характеристики</b>
1. Кожний досліджуваний матеріал, <b>контрольний</b> матеріал та матеріал порівняння повинен бути відповідним чином ідентифікований (наприклад, код, каталожний номер, назва, біологічні параметри).
2. Для кожного випробування кожна партія досліджуваних матеріалів, <b>контрольних</b> матеріалів і матеріалів порівняння повинна бути ідентифікована, включаючи номер партії, чистоту, склад, концентрацію й інші характеристики.
3. Якщо досліджувані матеріали, <b>контрольні матеріали і матеріали порівняння</b> поставляються Замовником, повинен існувати механізм, встановлений Замовником спільно із засобами тестування, відповідно до якого <b>в разі необхідності</b> перевіряється ідентичність досліджуваних матеріалів, які є об'єктом випробування.
4. Стабільність досліджуваних матеріалів, <b>контрольних</b> матеріалів та матеріалів порівняння при збереженні їх в умовах випробування повинна бути відома для всіх випробувань.
5. Якщо досліджувані матеріали, <b>контрольні матеріали та матеріали порівняння</b> поставляються в розчині, <b>в разі необхідності</b> повинна визначатись однорідність, концентрація і стабільність у розчині досліджуваного матеріалу. <i>У випадку польових випробувань досліджуваного матеріалу, ця робота може проводитись в окремих лабораторіях.</i>
6. Протягом випробування повинні бути проаналізовані зразки з кожної партії, за винятком короткострокових випробувань.

риклад, обмеження кількості речовин, що досліджуються одночасно, кольорове кодування зразків тощо.

Підзвітність та контроль за використанням речовин, що випробовуються, препаратів порівняння і речовин порівняння починається з моменту їх отримання і триває протягом всього випробування (до здачі їх в архів, повернення або знищення). Їх облік здійснюється при одержанні, зберіганні, оцінці і використанні (із зазначенням дати і виду випробування). Після завершення випробування ці відомості передаються в архів. Якість контролю використання сполук, що використовуються, підтверджується документами, в яких зафіксовано результати перевірок препаратів порівняння, особливо при проведенні операцій у критичні моменти випробування.

**Отримання, обробка, відбір зразків та їх зберігання.** Дані, щодо характеристики субстанції, дати її отримання, загальної використаної в ході випробування кількості, мають бути зафіксовані у відповідному журналі. Процедура обробки, відбору та зберігання зразків речовини, що досліджується, повинна бути визначена таким чином, щоб забезпечити в межах можливого її гомогенність та стабільність, а також сприяти запобіганню можливого зараження (забруднення) та змішування.

Визначення концентрації, стабільності та однорідності речовин, що випробовуються, препаратів порівняння та розчинників/носіїв може виявитися неможливим в разі проведення короткострокових випробувань. На відміну від досліджень, у яких готуються і використовуються великі партії речовин протягом певного часу, більшість випробувань *in vitro* допускає розчинення обмеженої кількості речовин безпосередньо перед використанням. У протоколі випробувань повинні бути ретельно викладені вимоги до приготування і використання розчинів речовин, що випробовуються, препаратів порівняння і речовин для порівняння. Якщо аналіз не буде проводитися, необхідно навести вичерпне обґрунтування цього факту у протоколі та звіті про випробування. Доцільно у звіті кваліфікувати цей виняток як такий, що відповідає вимогам GLP (див. розділ «Звіт про результати випробування»).

На контейнерах (ємкостях) для зберігання необхідно вказувати ідентифікаційну інформацію, дату закінчення терміну придатності та особливі вказівки зі зберігання.

**Характеристика.** Кожна речовина, що випробовується, і препарат порівняння повинні бути відповідним чином ідентифіковані (наприклад, код, хімічний абстрактний номер (ХАН), назва).

Для кожного випробування речовину необхідно ідентифікувати, тобто відповідним чином позначити кожен партію речовини, що випробовується, або препарату порівняння, а саме: зазначити номер партії, наявність домішок, склад, концентрацію та інші характеристики. Необхідно передбачити збереження стабільності речовин, що випробовуються, і препаратів порівняння за умов проведення випробувань. Якщо досліджувана речовина вводиться в тому або іншому середовищі, необхідно розробити СОП стосовно аналізу її однорідності та стабільності в даному середовищі. В разі проведення випробувань протягом терміну, що перевищує 4 тижні, з кожної партії відбирається зразок для аналізу на зберігання.

Досить часто виникає необхідність в дослідженні речовин, наданих замовником під кодами. В такому випадку замовник зобов'язаний надати характеристику та вичерпну інформацію стосовно даних речовин. При використанні кодованих назв повинна оцінюватися безпека лабораторії. Якщо під час роботи з такими речовинами може виникнути небезпека для персоналу, зазвичай замовник направляє відповідну інформацію безпосередньо в лабораторію. Інструкції з безпеки (наприклад, характеристика безпеки речовини) можуть бути надіслані відповідальному за техніку безпеки в лабораторії або до іншої відповідної служби, причому, в запечатаному конверті, який може розкриватися лише за умов виникнення небезпеки (при розлитті або безпосередньому впливові на персонал). Важливо, щоб постачальник кодованих «навантажень» речовин узяв на себе відповідальність за те, що «сліпе» кодування не вплине на результати випробування, забезпечивши лабораторію достатньою кількістю інформації для успішної роботи з цими речовинами.

**Організації-постачальники.** Принципами GLP визначено, що відповідальність за якість та придатність використовуваного у випробуваннях устаткування і матеріалів цілком покладається на керівника установи, яка здійснює випробування. Організації, які займаються постачаннями необхідних для випробувань матеріалів, не включені до національних програм відповідності принципам GLP. Отже, в установах (лабораторіях), що дотримуються принципів GLP, придатність устаткування та матеріалів повинна гарантуватися регулюючими органами, які контролюють випробування. У цьому розділі даються рекомендації щодо дотримання вимог GLP як установами, які здійснюють випробування, так і організаціями-постачальниками при участі їх в національних програмах з акредитації та/або розробці національних чи міжнародних стандартів. Установи, що проводять випробування, повинні враховувати національні або міжнародні стандарти, співвирізнявати з акредитованими організаціями-постачальниками.

Установи, які проводять випробування відповідно до принципів GLP, використовують різноманітні матеріали. Згідно принципів GLP організації-постачальники повинні надавати матеріали, які відповідають вимогам їх користувачів. Досить часто технологія виробництва, запроваджена організаціями-постачальниками, відповідає офіційним національним або міжнародним стандартам або офіційно визнається відповідними національними програмами.

Організаціям-постачальникам матеріалів та обладнання рекомендовано дотримуватися міжнародного стандарту ISO 9001–1987 і, зокрема, частини I – Нормативів з розробки, виробництва, впровадження та обслуговування, а також доповнення європейського стандарту EN 45001 (1989), де особливе значення має параграф 5.4.7, у якому викладено основний зміст субпідрядного договору.

Доречним є здійснення акредитації організацій-постачальників. Виконання програми акредитації часто контролюється національними та міжнародними стандартами. Так, сертифікат акредитації організації-постачальника або виробника є підтвердженням дотримання стандарту. Рекомендується, щоб організації-постачальники, при необхідності, брали участь у національних програмах акредитації.

Акредитація – це лише корисне доповнення до принципів GLP, але не є прийнятною їх альтернативою, тому, згідно з актами Ради ОЕСР, не має міжнародного визнання під час прийняття даних випробування на предмет їх відповідності вимогам GLP.

Відповідно до принципів GLP у протоколі випробування повинна міститися характеристика тест-систем: тварин, рослин тощо. Ці відомості повинні надаватися організаціями-постачальниками. У деяких країнах, де запроваджено принципи GLP, організації-постачальники належать до національних регулюючих або інших програм щодо акредитації (напр., стосовно лабораторних тварин), і можуть надати користувачам додаткові документи, які підтверджують якість тест-системи.

**Корм, вода та підстилка для тварин.** Корм для тварин повинен регулярно перевірятися з метою встановлення наявності регламентованого співвідношення його складових, а також усунення можливих невідповідностей тест-системи вимогами GLP, хоча ці вимоги спеціально не обумовлюються правилами GLP. Вода та підстилка повинні перевірятися на предмет присутності в них забруднювачів, які можуть вплинути на результати випробування. Сертифікати перевірок повинні в плановому порядку надаватися організаціями-постачальниками, в тому числі і стосовно аналізів води. Організації-постачальники мають надавати відповідні документи, що підтверджують надійність проведених перевірок.

Комерційні вимоги змушують організації, які поставляють радіоактивні хімічні сполуки, знаходити шляхи офіційної відповідності їхньої продукції вимогам GLP, беручи участь в національних програмах відповідності цим принципам. У багатьох випадках такі організації-постачальники випускають маркіровані тест-субстанції, які потребують повної totoжності, визначеної з використанням методів, що відповідають принципам GLP. Організаціям, що поставляють хімічні сполуки, маркіровані як радіоактивні, необхідна підтримка національних програм моніторингу відповідності принципам GLP.

**Комп'ютерні системи та програмне забезпечення.** Програмне забезпечення, включаючи отримане від організацій-постачальників, має перевірятися до його впровадження в роботу лабораторій. Відповідно до цієї вимоги, для офіційного затвердження засобу програмування доцільно, щоб постачальник розробляв його від імені користувача, за умови, що користувач бере на себе відповідальність за офіційне визнання даного засобу.

Користувач при одержанні від організації-постачальника засобів програмування повинен відповідати за офіційне їх визнання. Досить часто організації-постачальники докладають зусилля, спрямовані на задоволення вимог користувачів, дотримуючись при цьому стандарту ISO 9001. Вважається, що така стратегія ділового співробітництва дає позитивні результати.

Користувач відповідає за офіційне затвердження одержуваного ним програмного забезпечення. Процес офіційного затвердження може взяти на себе або користувач, або постачальник програмного забезпечення, проте в будь-якому випадку цей процес повинен бути вичерпно задокументований.

До обов'язків користувача входить офіційне затвердження отриманого ним засобу програмування до застосування його у випробуваннях. Затверджений засіб програмування повинен мати повну відповідну документацію.

Керівництво зобов'язане гарантувати, що всі препарати порівняння відповідають вимогам GLP за тотожністю, складом, чистотою та стабільністю кожної партії речовин.

Сертифікати, надані організаціями-постачальниками, повинні містити дані щодо тотожності, ступеня очищення (якщо необхідно, у спеціальних умовах) та інших параметрів, які характеризують кожен партію речовин. В особливих випадках може виникнути необхідність надання організацією-постачальником додаткової інформації, наприклад, про методи аналізу речовин. Організація-постачальник, при необхідності, повинна надавати документацію про відповідність речовин національним/міжнародним критеріям контролю якості, посилаючись, наприклад, на правила Надійної виробничої практики (GMP) або національної/міжнародної фармакопеї.

Керівництво несе відповідальність за те, щоб устаткування відповідало поставленим вимогам і функціонувало згідно інструкцій з експлуатації. Керівництво також повинно забезпечити регулярні перевірки справності устаткування та проведення його періодичного калібрування. Документи про калібрування повинні відповідати національним або міжнародним стандартам виміру. Якщо ці стандарти дотримуються користувачем, то калібрування приладів має проводитися у запропоновані інтервали часу компетентними організаціями.

Організація-постачальник повинна надавати всю інформацію, необхідну для правильної роботи приладів. Крім того, повинні бути надані документи про калібрування відомих гнівів приладів, наприклад, ваг і термометрів.

**Стерильні матеріали.** До обов'язків керівництва входить забезпечення, при необхідності, належної стерилізації матеріалів із дотриманням необхідних процедур. Організації-постачальники повинні бути готові надати відповідні докази, наприклад, сертифікати або посилання на національні стандарти, що матеріали простерилізовані (опроміненням, реактивами або іншими засобами) і не містять джерел інфекції або небажаних залишків реактивів стерилізації.

Користувач повинен бути впевненим, що реактиви отримані лише від офіційно визнаних (акредитованих) організацій-постачальників. Організація-постачальник повинна надавати документи, які засвідчують статус її акредитації. Якщо організація-постачальник не входить до національної програми акредитації, вона повинна надати користувачу документ, який гарантує тотожність реактиву відповідно до його маркірування.

Користувач відповідає за узгодження з організацією-постачальником того, що всі поставлені нею реактиви достатньо докладно маркіровані у відповідності до спеціальних вимог GLP.

**Миючі та дезинфікуючі засоби.** Користувач повинен бути поінформований про всі активні складові засобу, щоб мати можливість вибору його застосування та уникнення впливу можливих інфекцій та інших впливів, здатних порушити чистоту випробування.

## Належна лабораторна практика (GLP)

Стосовно продукції, що використовується при проведенні мікробіологічних випробувань, згідно з договором з організацією-постачальником, останній надає користувачеві таку інформацію:

- походження;
- тотожність;
- дата виробництва;
- термін придатності;
- умови зберігання.

Організація-постачальник повинна надавати документацію, яка свідчить про статус її акредитації. Якщо ж вона не входить до національної програми по акредитації, то користувачу надається документ, який підтверджує тотожність продукції відповідно до її маркування.

**Стандартні операційні процедури (СОП).** Принципи GLP стосовно СОП подані в табл. 7. СОП – це документи, у яких розписані процедурні аспекти лабораторії, що працює за принципами GLP. Вони стосуються всіх категорій засобів, перерахованих у табл. 7. Загалом, вони встановлюють стандарти, згідно з якими працюють установи, що проводять випробування при узгодженні з керівником установи, відповідальним виконавцем і службою контролю якості.

Таблиця 7

### Стандартні Операційні Процедури

7.1 Тест-система повинна мати СОП у письмовому вигляді, затверджений керівником установи та призначений забезпечувати отримання тест-системою якісних і достовірних даних. Зміна СОП повинна затверджуватися керівником установи.
7.2 Кожна окрема тест-система повинна мати легко доступні СОП, що визначають її діяльність. Книги, опубліковані аналітичні методика, статті та посібники можуть служити доповненням до цих СОП.
7.3 Відхилення від СОП, що кваліфікуються як допустимі, визначаються відповідальним виконавцем випробування та головним дослідником.
7.4 СОП повинні охоплювати, але не обмежуватися, приведеними нижче категоріями тест-систем. Деталі, приведені під кожним заголовком, варто розцінювати, як ілюстративні приклади.
1. Досліджувані матеріали, <b>контрольні</b> матеріали та матеріали порівняння Одержання, ідентифікація, маркування, використання, контроль та зберігання
2. Апаратура, матеріали та реагенти 1) <i>Апаратура</i> Використання, утримання, чищення, <b>перевірка робочих характеристик</b> та калібрування 2) <i>Комп'ютеризовані системи</i> Перевірка, функціонування, утримання, безпека, резерви 3) <i>Матеріали, реагенти та розчини</i> Приготування і маркування
3. Звітність, зберігання та пошук Кодування випробувань, збір даних, підготування звітів, система індексування, обробка даних, включаючи використання комп'ютерних систем
4. Тест-системи 1) Підготування кімнат, <b>плонч та обладнання</b> 2) Процедури отримання, транспортування, належного розміщення, характеристики, ідентифікації та догляду за тест-системами 3) Підготовка, нагляд та перевірка тест-систем до, в процесі та по закінченню випробування 4) Перевірка <b>тест-систем на забруднення та наявність дефектів. Порядок дій при виявленні вмираючих або мертвих матеріалів.</b> 5) Збір, ідентифікація та обробка зразків (включаючи некропсію та гістопатологію). 6) <b>Розміщення та встановлення тест-систем на місцях випробування</b>
5. <i>Процедури із забезпечення якості</i> Діяльність персоналу служби контролю якості з протоколювання, упорядкування графіків, здійснення, документування та звітності про контрольні інспекції.



Процедура підготовки, розподілу та підтримки СОП повинна розглядатися як СОП. У цьому документі для забезпечення послідовності викладу матеріалу повинен бути визначений формат СОП, включаючи заголовки і нумерацію розділів. СОП може писатися колективом авторів, відбиваючи експертну роботу багатьох співробітників усередині організації. СОП повинні бути розглянуті та затверджені відповідними підписами керівника установи, відповідального виконавця та керівника служби якості.

Необхідно здійснювати контроль забезпечення функціонування в даний момент лише поточних затверджених СОП. З огляду на те, що СОП є підконтрольним документом, доцільно на кожній його сторінці передбачити ідентифікаційний номер та номер версії. Адміністрація повинна забезпечити призначення особи, відповідальної за використання затверджених СОП, їх належний розподіл між персоналом та регулярну перевірку дотримання СОП.

Копії кожного заміненого або вилученого СОП повинні зберігатися в архіві. На ці документи можна посилалися при організації випробування.

Лабораторія, яка проводить випробування, повинна мати СОП у письмовому вигляді, затверджені керівництвом. Вони призначені для забезпечення якості та цілісності даних, отриманих у ході випробування.

В кожній окремій групі, що входить до складу лабораторії, повинні бути під рукою СОП стосовно виду діяльності, яку виконус дана група. Опубліковані підручники, статті та довідники можуть використовуватися як доповнення до цих СОП.

Обов'язком керівника установи є призначення особи, відповідальної за ведення системи СОП. Її функції полягають у перевірці СОП через певні проміжки часу, своєчасному введенні нових, удосконалених СОП, відповідному розподілі їх, а також забезпеченні ведення історичного файлу СОП, що запроваджуються. У випадку багатоцентричних випробувань може виникнути необхідність у призначенні особи, яка б відповідала за організацію і контроль СОП для кожного місця випробувань. Процедура введення СОП, організованих таким чином, повинна бути уточнена в протоколі випробувань.

СОП повинні охоплювати, але не обмежуватися, наступними категоріями діяльності лабораторії:

- *Речовини, що випробовуються, та препарати порівняння*

Отримання (прийом), ідентифікація, маркірування, опрацювання, відбір зразків та їхнє зберігання.

- *Інструментальні засоби (прилади) та реактиви*

Застосування, обслуговування, чищення, калібрування вимірювальних приладів та устаткування, засобів контролю навколишнього середовища; приготування реактивів.

*Ведення записів (протоколювання), підготовка звіту, зберігання та пошук матеріалів випробування*

Кодування випробувань, збір даних, підготовка звітів, індексування систем, обробка даних, включаючи застосування комп'ютерних систем.

- *Тест-система (де потрібно)*

• підготовка приміщень та забезпечення належних умов навколишнього середовища для тест-системи;

• процедури отримання, передачі, належного розташування, характеристики, ідентифікації та догляду за тест-системою;

• підготовка тест-системи, аналіз спостережень перед, під час та по завершенню випробувань;

• обробка суб'єктів тест-системи, які виявилися вмираючими або мертвими під час випробування;

• збір, ідентифікація та опрацювання проб, включаючи розтин трупа і гістопатологію.

- *Процедури забезпечення контролю якості*

Робота персоналу служби гарантії якості при виконанні досліджень та підготовці звіту про перевірку випробування, інспекторські перевірки та огляди заключних звітів випробування.

– *Запобіжні заходи стосовно здоров'я персоналу*

Відповідно до вимог національних та/або міжнародних законодавчих актів або керівництв.

Якщо при багатоцентровому випробуванні розробляються загальні СОП для всіх лабораторій, перед початком випробувань необхідно встановити порядок затвердження цих документів, їх надходження до безпосередніх виконавців та архівування. Якщо існує відмінність між протоколом випробування і СОП, необхідно уточнити, який з цих документів є головним для випробування. При багатоцентровому випробуванні може бути корисним, коли головна установа-виконавець візьме на себе забезпечення СОП для установ-співвиконавців. Це сприяло б зменшенню навантаження та забезпеченню однорідності процедур між учасниками випробування.

**Контроль критеріїв достовірності.** Одним із головних доповнень до принципів GLP є концепція визначення критеріїв достовірності кінцевих результатів випробувань.

Відгук тест-системи на дію препаратів порівняння зазвичай є основою для визначення достовірності випробування. У деяких випробуваннях для визначення достовірності використовуються як негативні, так і позитивні речовини і препарати порівняння, в інших – лише позитивні. Статистичні параметри ефектів досліджуваного та порівняльного препаратів порівнюються між собою на основі критеріїв (меж) достовірності, визначених протоколом випробувань. Сукупність отриманих величин звичайно подається у вигляді показників середньої статистичної величини та стандартного відхилення. Ці величини визначають точність випробування. В ідеалі, кожний кінцевий результат випробування повинен порівнюватися з контролем і мати відповідні статистичні характеристики. Наявність контролю забезпечує порівняння даних, отриманих різними лабораторіями та у різний час.

**Підготовка випробування.** Перед початком випробування для відповідального виконавця може бути корисною організація зборів з метою обговорення протоколу випробування. На таких зборах варто чітко визначити систему взаємозв'язку всередині випробування. Встановлення відкритого двостороннього зв'язку між відповідальним виконавцем і персоналом є важливим фактором ефективного контролю випробувань. Крім обговорення протоколу, проведення таких зборів може включати практичну демонстрацію залучених до випробування технологій.

**Протокол випробування** (табл. 8). Для кожного виду випробування до його початку потрібно мати викладений у письмовій формі протокол його проведення.

Необхідно забезпечити наявність достатньої інформації для формування детального протоколу, який би з максимальною ясністю визначав хід випробування. Важко переоцінити значення старанно складеного детального протоколу випробувань. Він включає опис концептуальної побудови випробування (тобто визначення, що підлягає випробуванню та як воно здійснюється), перелік вихідних даних, які необхідно одержати, процедур опрацювання вихідних даних для отримання остаточних результатів, схему інтерпретації кінцевих результатів, а та-

Таблиця 8

### Проведення випробування

#### 8.1 Протокол випробування

1. Для кожного випробування до його початку повинен бути сформований протокол випробування в письмовій формі. Протокол випробування повинен затверджуватися датованим підписом відповідальним виконавцем та узгоджуватись з персоналом служби контролю якості на предмет його GLP - відповідності (табл. 2). Протокол випробувань повинен також затверджуватись керівником установи, а також Замовником, якщо того потребує національне законодавство країни, у якій проводиться випробування.

2. 1) Поправки до протоколу випробувань повинні бути узгоджені та затверджені відповідальним виконавцем. Вони зберігаються разом із протоколом випробування  
2) Відхилення від протоколу випробувань повинні бути описані, пояснені, обґрунтовані і датовані відповідальним виконавцем та/або головним дослідником. Вони зберігаються разом із вихідними даними випробування.

3. Для короткострокових випробувань може використовуватися генеральний протокол випробування зі спеціальними додатками.

<b>8.2 Зміст протоколу випробувань</b>
Протокол випробування повинен містити, але не обмежуватися, наступною інформацією:
<p>1. Ідентифікація випробування, <b>досліджувані матеріали, негативні контрольні матеріали, позитивні контрольні матеріали, матеріали порівняння:</b></p> <ol style="list-style-type: none"> <li>1) описовий заголовок</li> <li>2) формулювання природи та мети випробування</li> <li>3) ідентифікація <b>досліджуваного матеріалу</b> за кодом або назвою</li> <li>4) матеріали порівняння, що будуть використовуватися (в разі необхідності)</li> <li>5) <b>негативні контрольні матеріали</b></li> <li>6) <b>позитивні контрольні матеріали</b></li> </ol>
<p>2. Інформація, що стосується Замовника та Установи-виконавця:</p> <ol style="list-style-type: none"> <li>1) ім'я та адреса Замовника;</li> <li>2) ім'я й адреса керівника установи та окремих випробувань;</li> <li>3) ім'я та адреса відповідального виконавця;</li> <li>4) ім'я та адреса головних дослідників, а також найменування фаз випробування, делегованих відповідальним виконавцем головним дослідником;</li> </ol>
<p>3. Дати:</p> <ol style="list-style-type: none"> <li>1) дата затвердження протоколу випробування відповідальним виконавцем. Протокол випробувань повинен також затверджуватись керівником установи, а також Замовником, якщо того потребує національне законодавство країни, у якій проводиться випробування;</li> <li>2) запропоновані дати початку та закінчення випробування.</li> </ol>
<p>4. Методи тестування.</p> <p>Повинні бути приведені посилання на ОЕСР посібник із випробувань, або на інші посібники або методи випробування.</p>
<p>5. Вихідні передумови (за необхідності):</p> <ol style="list-style-type: none"> <li>1) обґрунтування вибору <b>тест-систем</b>;</li> <li>2) <b>характеристики тест-систем in vitro, такі, як вид вихідних тварин та тканин, джерело постачання, умови культивування й інша доречна інформація;</b></li> <li>3) методи застосування препаратів та обґрунтування їхнього вибору;</li> <li>4) рівень доз та/або концентрацій, частота і тривалість введення/аплікації. <b>Кількість досліджуваних груп і кількість дубльованих експериментів усередині кожної групи.</b></li> <li>5) детальна інформація про побудову експерименту, включаючи хронологічний опис процедур випробування, про методи, матеріали та умови, <b>про використання позитивних та негативних контрольних матеріалів</b>, тип та частоту аналізу, вимірів, спостережень і тестування, а також про застосування статистичних методів;</li> <li>6) визначення критеріїв приймання результатів по закінченню.</li> </ol>
<b>8.3 Проведення випробувань</b>
<p>1. Кожне випробування повинно мати свою унікальну ідентифікацію. Всі матеріали, що відносяться до даного випробування, повинні нести цю ідентифікацію. Зразки даного випробування повинні нести інформацію про їхнє походження. Така ідентифікація забезпечує можливість оперативного контролю випробування.</p>
<p>2. Випробування повинно проводитись згідно його протоколу.</p>
<p>3. Всі дати подій, що відбуваються під час випробувань, повинні бути прямо, вірно, акуратно та чітко зареєстровані особою, яка отримує дані. Ці дані повинні бути підписані та датовані.</p>
<p>4. Всі зміни у вихідних даних повинні вноситися таким чином, щоб не створювати неясності в попередніх записках. Повинна бути зазначена причина змін, вони повинні бути підписані і датовані особою, що вносить зміни.</p>
<p>5. Дані, що безпосередньо вводяться в комп'ютер, повинні бути ідентифіковані за часом введення; за це відповідає особа, що вводить дані. Комп'ютеризовані системи повинні бути сконструйовані таким чином, щоб забезпечити проведення повних інспекторських перевірок усіх змін даних, а також підтвердження того, що ці зміни не вплинули на вихідні дані. Необхідно забезпечити можливість ідентифікації особи, яка вносила зміни, наприклад, використовуючи електронне датування та підпис. Повинна бути приведена причина внесених змін.</p>

кож критерії достовірності випробування. Протокол має бути написаний таким чином, щоб виключити можливість неправильного його трактування персоналом. Ця вимога особливо важлива, коли більше ніж одна установа (лабораторія) використовує один протокол.

Протокол випробування повинен зберігатися так само, як і вихідні дані.

Якщо пропонуються зміни до протоколу випробувань, вони повинні бути внесені в протокол до їхньої практичної реалізації. Необхідність змін може виникнути під час проведення випробування в результаті непередбачених обставин, що потребують оперативного реагування. Зміни в протоколі випробування повинні бути послідовно пронумеровані із зазначенням їх причин та затверджені датованим підписом відповідального виконавця і, за необхідності, головного дослідника та керівника установи. Всі зміни повинні бути доведені до всіх осіб, які одержали початковий протокол випробувань.

Протокол випробування повинен містити, але не обмежуватися, такою інформацією:

*Визначення виду випробування, речовини, що випробовується, та препарату порівняння*

- назва;
- мета випробування;
- визначення речовини, що випробовується за кодом або назвою (IUPAC; ХАН тощо);
- визначення препарату порівняння.

– *Інформація про замовника та установу (лабораторію), яка проводить випробування*

- назва (ім'я) та адреса замовника;
- назва та адреса установи, яка проводить випробування;
- ім'я та адреса керівника випробування.

– *Терміни*

- дата узгодження протоколу випробування, підписана керівником випробування, і в разі потреби, замовником та/або керівником установи, що проводить випробування;
- дати початку та завершення випробування.

– *Методи дослідження*

- посилання на Посібник з випробувань ОЕСР та інші посібники, що будуть використовуватися.

– *Первинні дані (якщо потрібно)*

- обґрунтування вибору тест-системи;
- характеристика тест-систем (види, лінії, штами, джерела постачання, номери, маса тіла, стать, вік та інша інформація, що стосується цих систем);
- спосіб уведення досліджуваної речовини та обґрунтування його вибору;
- рівні доз та/або концентрацій, частота, тривалість введення;
- докладна інформація про експериментальний план, включаючи хронологічний опис процедур випробування, усі методи, матеріали та умови, види та частота проведення аналізів, вимірів, спостережень і випробувань, що будуть виконуватися.

– *Документація*

- перелік документів, що будуть зберігатися.

При багатоцентрових випробуваннях протокол випробування повинен містити інформацію щодо прізвища та адреси головного дослідника, розташування установ (лабораторій) випробування, складових випробування, методів і статистичних показників, місця розташування архіву для збереження документації, що стосується випробувань, за що відповідає головний дослідник, відповідність випробування вимогам GLP (включаючи національні вимоги) і календарному графікові, який визначає послідовність проведення випробування. Протокол випробування повинен включати процедури реєстрації даних з метою забезпечення сумісного отримання результатів усіх лабораторій, включених у багатоцентрові випробування та відповідності даних вимогам відповідального виконавця.

У протоколі необхідно зазначити, які матеріали підлягають збереженню в архіві, а також визначити місце їх зберігання.

Протокол випробування вважається затвердженим документом після його підписання відповідальним виконавцем, керівником установи, яка проводить випробування та, в разі потреби, спонсором (замовником). Протокол має бути розданий персоналу випробування та співробітникам служби гарантії якості, яка при плануванні інспекторських перевірок повинна спиратися на інформацію, наведену в протоколі.

Протокол випробування відрізняється від експериментального плану, оскільки він є спеціальним документом для складових випробувань і буде обговорюватися пізніше.

**Примітки.** Примітки є засобом реєстрації додаткової інформації про випробування, наприклад, відхилення від протоколу випробування. Примітки можуть вноситися персоналом, але повинні доводитися до відома відповідального виконавця, який підтверджує їх коректність та забезпечує подальшу інформованість щодо їх наявності. Послідовна нумерація приміток полегшує контроль за випробуванням. Значні відхилення від протоколу випробувань доречно класифікувати та документувати як поправки до протоколу.

Всі зміни, модифікації або виправлення протоколу, узгоджені з відповідальним виконавцем, включаючи обґрунтування внесених змін, повинні бути задокументовані, датовані та підписані відповідальним виконавцем і зберігатися разом із протоколом випробування.

**Проведення випробування.** Кожне випробування, а також всі його етапи повинні бути чітко визначеними. Випробування повинні проводитися згідно з протоколом. Всі дані, отримані під час проведення випробувань, повинні реєструватися безпосередньо, відразу, чітко та у доступній формі особою, яка їх отримує та фіксує, а також ставить свій підпис і дату.

Персонал випробування повинен чітко усвідомлювати, що розуміється під вихідними даними. Визначення вихідних даних (див. Основні терміни та поняття) повинно бути задокументовано. Записи вихідних даних повинні давати можливість відтворення випробувань. Завдяки ним має бути можливим визначення всіх дій, які відбувались протягом виконання випробувань, чому, де, ким вони виконувались та які засоби при цьому були залучені. Тому всі дані повинні реєструватися акуратно, чітко і вірно. Будь-які корективи вносяться без виправлень оригінальних даних. Вони повинні бути підписані і датовані з наведенням причин внесення поправок. Вихідні дані включають не лише спеціальну документацію з проведення випробування, але і загальні записи, що стосуються апаратури, матеріалів та реактивів, препаратів порівняння, посіїв, а також тест-систем. Протягом випробування вихідні дані повинні знаходитися на місці проведення випробувань, а не передаватися до архіву для довгострокового зберігання.

Будь-які зміни у вихідних даних повинні вноситися таким чином, щоб не створювати зміст раніше написаного. При цьому необхідно вказувати причину поправок, а під ними повинні стояти дата і підпис особи, яка їх вносить.

Дані, отримані і безпосередньо введені в комп'ютер, необхідно ідентифікувати під час їх вводу особою (-ами), відповідальною за внесення даних. Виправлення повинні вноситися окремо із зазначенням причин, дати і даних про особу, яка робить зміни.

**Служба контролю якості.** Установи, які проводять випробування, повинні мати службу по забезпеченню контролю якості для гарантії того, що випробування виконуються відповідно до принципів GLP.

Програма гарантії якості має виконуватися особою або особами, добре знайомими з процедурами випробування. Вони призначаються та підпорядковуються безпосередньо керівнику установи (лабораторії). Цю особу (особи) не варто залучати до проведення випробувань, якість яких контролюється.

Служба контролю якості повинна повідомляти про будь-які виявлені факти невідповідності принципам GLP у письмовій формі безпосередньо керівнику установи або відповідальному виконавцю.

Основними обов'язками служби контролю якості є:

– пересвідчитись, що протокол випробування та СОП доступні персоналу, який проводить випробування;

## **Належна лабораторна практика (GLP)**

– забезпечувати періодичну перевірку лабораторій та/або виконуваних ними досліджень щодо дотримання протоколу випробування та СОП. Записи про ці перевірки повинні зберігатися;

– негайно повідомляти керівника установи (лабораторії) або відповідального виконавця про несанкціоновані відхилення від протоколу випробування та СОП;

– переглядати заключні звіти для підтвердження того, що методи, процедури і спостереження точно описані, а внесені до протоколу результати точно відображають вихідні дані випробування;

– готувати і підписувати спеціальний висновок, в якому повинні бути зафіксовані дати проведених інспекцій, виявлені факти невідповідності GLP, про які повідомлено керівнику установи та відповідальному виконавцю. Цей висновок має додаватись до заключного звіту

Основним обов'язком керівника установи (лабораторії), яка проводить випробування, є забезпечення її функціонування у відповідності з принципами GLP. Керівництво може доручати проведення контролю за діяльністю лабораторії галузевій керівній організації, але завжди зберігає повну відповідальність за його здійснення. Одним із важливих обов'язків керівника лабораторії є призначення кваліфікованого та досвідченого персоналу служби контролю якості.

Має бути чітко визначений менеджер, який несе основну відповідальність за дотримання вимог GLP. До його обов'язків входить призначення персоналу з відповідною кваліфікацією, як для експериментальної програми, так і для проведення незалежної функції по забезпеченню контролю якості. Керівництво, відповідно до принципів GLP, повинно стежити за тим, щоб персонал служби контролю якості не брав участі у проведенні випробувань, які контролюються. Особа, на яку покладається відповідальність за функціонування служби гарантії якості, повинна мати можливість прямого зв'язку з різними рівнями керівництва, зокрема, з керівником установи, що проводить випробування.

Персонал служби контролю якості повинен бути навченим, мати практичні навички, знання і досвід, необхідні для виконання своїх обов'язків. Він має бути знайомий із процедурами випробування, стандартами і системами, які застосовуються установою (лабораторією), що проводить випробування. Особи, призначені для виконання функцій по забезпеченню контролю якості, повинні чітко розуміти теоретичні концепції, що лежать в основі досліджень, моніторинг яких проводиться. Вони повинні також повністю розуміти принципи GLP.

У випадку недостатності спеціальних знань або при необхідності отримання додаткової інформації рекомендується звертатися до спеціалістів. Керівництво також повинно гарантувати наявність навчальної програми, яка охоплює всі аспекти роботи по забезпеченню контролю якості. Програма навчання повинна, по можливості, включати отримання досвіду, на робочому місці, під наглядом компетентного і навченого персоналу. Доцільне також відвідування персоналом служби контролю якості семінарів і курсів, як за місцем роботи, так і за її межами. Наприклад, бажано пройти навчання на курсах з отримання навичок спілкування та вирішення конфліктних ситуацій. Навчання повинно проводитись без відриву від виробництва і підлягати періодичним перевіркам.

Керівник установи відповідає за забезпечення розробки та впровадження протоколу випробувань та СОП. Персонал служби контролю якості, як правило, не залучається до розробки проекту СОП, проте, бажано, щоб він переглядав СОП перед використанням з метою оцінки ясності їх викладення та узгодженості з принципами GLP.

Керівник установи повинен забезпечити доступність протоколу випробування персоналу служби контролю якості до початку випробування. Це дозволяє службі контролю якості:

- контролювати відповідність протоколу випробувань принципам GLP;
- оцінювати чіткість та послідовність протоколу випробувань;
- визначати критичні фази випробувань;
- планувати програму моніторингу стосовно випробувань.

Про внесення правок до протоколу випробувань варто інформувати службу контролю якості з метою полегшення проведення ефективного моніторингу.

Програма контролю якості ґрунтується на проведенні різних видів перевірок:

– *Безпосередні перевірки випробування*: вони розписані відповідно до хронології даного випробування, зазвичай, спочатку визначаються критичні фази випробування.

– *Інспекції лабораторій, які проводять випробування*: вони не стосуються контролю спеціальних випробувань, але зачіпають загальні приміщення і види діяльності всередині лабораторії (обладнання, технічне обслуговування, комп'ютерні системи, навчання, вплив на навколишнє середовище, експлуатація, калібрування тощо).

– *Перевірки ходу випробування*: вони також проводяться незалежно від спеціальних випробувань і здійснюються з метою контролю та спостереження за випробуваннями, які часто повторюються, і тому перевірки, як правило, проводяться вибірково. Вважається недоцільним проводити безпосередні інспекції випробувань, які постійно повторюються.

Персонал служби контролю якості повинен планувати свою роботу належним чином, а заплановані ним процедури мають бути описаними відповідними СОП. Слід вести перелік запланованих і поточних випробувань та оцінки робочого навантаження персоналу служби контролю якості.

Як і у випадку з будь-якими іншими СОП згідно принципів GLP СОП стосовно інспекції та перевірки повинні бути перевірені керівництвом. Персонал та керівник служби контролю якості повинні обґрунтувати слушність вибору методів вирішення поставлених перед ними задач.

Національні органи з моніторингу виконання принципів GLP можуть запросити інформацію про характер і дати перевірок, проведених службою контролю якості. Але звіти персоналу служби контролю якості про інспекції, як правило, не повинні розглядатися на предмет їх змісту національними органами, які проводять моніторинг, оскільки це може уповільнити роботу служби контролю якості внаслідок підготовки звітів про виконані перевірки. Проте, національні моніторингові органи можуть періодично вимагати доступ до змісту інспекційних звітів для того, щоб переконатися в адекватному функціонуванні служби контролю якості, але не з метою виявлення фактів невідповідності принципам GLP при виконанні випробувань.

Ознайомлення з вихідними даними випробувань персонал служби контролю якості може виконувати по-різному. Наприклад, можуть розглядатись записи щодо експериментальних фаз випробування у процесі перевірок або під час перевірки заключних звітів. Керівництво повинно забезпечити перевірку службою контролю якості усіх заключних звітів, які претендують на відповідність принципам GLP. Ця перевірка повинна проводитися на етапі підготовки заключного проекту, коли усі вихідні дані зібрані і ніякі зміни не передбачаються.

Завданням перевірки заключного звіту є визначити:

- відповідність проведення випробування протоколу та СОП;
- достатню чіткість та повноту викладення результатів випробування у звіті;
- відповідність всіх складових частин звіту вимогам GLP;
- узгодженість звіту;
- повноту вихідних даних та їх відповідність GLP.

Персонал служби контролю якості може визнати доцільним записувати результати перевірки заключного звіту у формі, достатньо деталізованій для відновлення процесу перевірки. Процедури мають бути розроблені таким чином, щоб під час перевірки служба контролю якості була у курсі всіх доповнень або змін щодо даних та звіту про випробування.

До підписання висновку служба контролю якості повинна переконатись, що: всі спірні питання, які виникли в ході перевірки, були належним чином подані в заключному звіті; вжито усі необхідні заходи; до звіту не внесено будь-які зміни, які б вимагали наступної перевірки.

Будь-які виправлення або доповнення до заключного звіту повинні перевірятися службою контролю якості. При необхідності можна надавати переглянутий або додатковий висновок щодо забезпечення контролю якості.

Висновок, підписаний службою контролю якості відповідно до принципів GLP, повинен включатись до заключного звіту і містити інформацію про дати проведених перевірок, а також

дати повідомлення керівника установи та керівника випробувань про виявлені факти невідповідності принципам GLP. Керівник установи зобов'язаний забезпечити, щоб даний висновок містив прийнятий службою контролю якості офіційний звіт керівника випробування, відповідно до вимог GLP, і входив до заключного звіту.

Форма висновку служби контролю якості повинна відповідати суті звіту. Висновок має включати повну назву випробування та дати перевірок, здійснених персоналом служби контролю якості. Якщо індивідуальні перевірки випробування не були частиною запланованої програми, необхідно надати висновок про забезпечення контролю якості, в якому деталізовано проведені моніторингові перевірки, наприклад, у випадку короткострокових випробувань, коли повторні перевірки кожного випробування є недоцільними.

У висновку необхідно вказати, що звіт про випробування точно відображає результати випробування. За відповідальним виконавцем залишається зазначення у заключному звіті будь-яких моментів невідповідності принципам GLP.

Відповідність принципам GLP є регульованою вимогою, запропонованою при прийнятті результатів випробувань. Проте, випробування деяких засобів може здійснюватись в дослідженнях, які не падають на розгляд регулюючим органам. Якщо перегульовані випробування не проводяться у відповідності зі стандартами, подібними до принципів GLP, це зазвичай негативно впливає на відповідність вимогам випробувань, що регламентуються принципами GLP.

З метою здійснення належної оцінки робочого навантаження, придатності обладнання тощо, до переліку випробувань, які контролюються персоналом служби контролю якості, необхідно вказувати як регульовані, так і перегульовані випробування. Дослідження, які виконуються не за вимогами GLP, після початку випробувань не можуть претендувати на відповідність принципам GLP. Якщо випробування, заплановано як таке, що відповідає принципам GLP, але не проводиться згідно вимог GLP, це повинно бути чітко відображено в документах.

У невеликих лабораторіях, які проводять випробування, може бути недоречним утримання персоналу, зайнятого лише забезпеченням контролю якості. Проте, керівництво повинно надати, принаймні, одну індивідуальну постійну, можливо, за сумісництвом, посаду для координації функцій забезпечення контролю якості. Бажано зберігати деяку сталість стосовно персоналу служби контролю якості з метою накопичення досвіду та забезпечення відповідної інтерпретації результатів перевірок. Для осіб, які беруть участь у випробуваннях, що відповідають принципам GLP, прийнятно виконувати функцію забезпечення контролю якості стосовно випробувань, які проводяться в інших підрозділах всередині лабораторії, що перевіряється. Для персоналу служби контролю якості, який не належить до даної лабораторії, прийнятним є здійснення функцій по забезпеченню контролю якості відповідно до вимог GLP.

Ця концепція може стосуватись випробувань, які проводяться у багатьох лабораторіях, за умови чітко визначеної загальної відповідальності за координацію дій.

**Конфіденційні матеріали.** При багатоцентрових випробуваннях необхідно забезпечити умови, за яких конфіденційність не впливала б на передачу інформації між установами. Персоналу випробування доцільно відповідно помітити такі матеріали.

**Звітність про результати випробування.** Принципи GLP, специфічні для звіту про результати випробування, подані в табл. 9. Згідно принципів GLP, затверджених ОЕСР, використовують термін «заключний звіт». У даному документі замість цього терміну вживається термін «звіт про випробування», який визначає звіт про складове випробування (див. розділ «Звіт про випробування»).

Звіт про випробування повинен бути своєчасно складений. Він підписується і датується керівником випробування, який бере на себе відповідальність за правильність даних, відповідність звіту виконаній роботі та надання всіх отриманих даних. При багатоцентрових випробуваннях у звіті повинна бути розкрита і визначена роль головного дослідника та складових місць випробування.



## Звіт про результати випробування

<b>9.1 Загальні відомості</b>
1. Звіт про <b>випробування</b> повинен подаватись для кожного випробування. При короткострокових випробуваннях може бути поданий стандартизований звіт про <b>випробування</b> зі специфічними для даного випробування доповненнями
2. Звіти головного дослідника або вчених, що приймають участь у випробуванні, повинні бути підписані і датовані ними.
3. Звіт про <b>випробування</b> підписується і датується відповідальним виконавцем, який приймає таким чином відповідальність за достовірність даних. Повинен бути засвідчений ступінь відповідності випробування принципам GLP.
4. Коректування і доповнення до звіту про випробування повинні проводитися у формі поправок. Поправки повинні ясно визначати причини коректувань і доповнень, та підписуватися і датуватися керівником випробування.
5. Приведення звіту про <b>випробування</b> у відповідність із вимогами національних реєструючих та регулюючих органів не вважається коректуваннями, доповненнями або поправками до звіту про <b>випробування</b> .
<b>9.2 Зміст звіту про випробування</b>
Звіт про випробування повинен включати, але не обмежуватися, наступною інформацією.
1. Ідентифікація випробування, досліджуваних матеріалів, контрольних <b>матеріалів і матеріалів</b> порівняння: 1) описовий заголовок; 2) ідентифікація досліджуваного матеріалу за кодом або назвою; 3) ідентифікація <b>контрольних матеріалів</b> та матеріалів порівняння, що будуть використовуватися (за необхідності); 4) характеристика досліджуваних матеріалів за чистотою, стабільністю та однорідністю.
2. Інформація, що стосується Замовника та Установи-виконавця: 1) ім'я та адреса Замовника; 2) ім'я й адреса керівника установи та окремих випробувань; 3) ім'я та адреса відповідального виконавця; 4) ім'я та адреса головних дослідників, а також найменування фаз випробування, делегованих відповідальним виконавцем головним дослідникам; 5) ім'я й адреса вчених, що надають складові звіти для звіту про випробування.
3. Дати: Дати початку та закінчення експериментів.
4. Акти. Список актів служби контролю якості про дати і типи інспекцій, включаючи інспекції фаз випробування, дати доповідей результатів інспекцій відповідальному виконавцю і головному досліднику, в разі необхідності. Ці акти повинні також служити підтвердженням того, що звіт відображає вихідні дані.
5. Опис матеріалів і методів; 1) опис застосованих матеріалів і методів тестування; 2) посилання на ОЕСР посібник із тестування, або на інші посібники або методи тестування.
6. Результати: 1) зведення результатів; 2) вся інформація і дати, що потребуються для протоколу випробувань; 4) подання результатів, включаючи обчислення, визначення статистичної достовірності і статистичних значень <b>контрольних даних</b> ; 5) оцінка та обговорення результатів, висновки, де необхідно.
7. Зберігання: Розташування місця зберігання протоколу випробувань, зразків, <b>контрольних матеріалів та матеріалів порівняння</b> , проб, вихідних даних і звіту про <b>випробування</b> .

Звіт про випробування повинен містити висновок про відповідність проведення досліджень та звіту вимогам GLP, а також ясного визначення відхилень випробування від правил GLP, якщо такі є. Такий висновок підписується і датується відповідальним виконавцем і ґрунтується на статусі GLP всіх лабораторій, які беруть участь у випробуванні, причому не лише в ме-

жах національних програм з GLP. При багатоцентрових випробуваннях може бути доцільним, щоб головний дослідник включив підписаний висновок про відповідність GLP у свій частковий звіт, який направляється відповідальному виконавцю.

Висновок про відповідність принципам GLP не повинен підмінюватися висновком служб контролю якості, який має бути у звіті у вигляді окремого та незалежного результату моніторингу випробування цими службами.

Відповідальний виконавець повинен затвердити і підписати будь-які виправлення та/або доповнення до звіту про випробування.

Після закінчення випробувань необхідно підготувати заключний звіт. Рекомендується застосування міжнародної системи одиниць (SI).

Відповідальний виконавець повинен підписати заключний звіт із зазначенням дати. Якщо звіти основних виконавців за суміжними дисциплінами внесені до заключного звіту, то на них повинні стояти їх підписи із зазначенням дати.

Виправлення та доповнення до звіту повинні бути у формі поправок. Поправки повинні чітко вказувати причину виправлень, доповнень і бути підписані відповідальним виконавцем та головним фахівцем з кожної дисципліни, задіяної у проведенні випробування.

Звіт повинен включати, але не обмежуватися, наступною інформацією:

– *Ідентифікація випробування, речовини, що випробовується, і препарату порівняння*

- описова назва;
- визначення речовини, що випробовується, за кодом або назвою (IUPAC; ХАН, номер і т.д.);
- визначення препарату порівняння за хімічною назвою;
- характеристика речовини, що випробовується, включаючи наявність домішок, стабільність та гомогенність.

– *Інформація стосовно установи, що проводить випробування*

- назва та адреса;
- ім'я відповідального виконавця;
- імена основних виконавців окремих фрагментів заключного звіту.

*Терміни*

- дати початку та завершення випробування.

– *Висновок*

• висновок служби контролю якості із зазначенням дат проведення інспекцій та повідомлень відповідального виконавця про виявлені факти порушень.

– *Опис матеріалів та методів дослідження*

- перелік матеріалів та методів;
- посилання на посібники ОЕСР з випробувань та інші керівництва.

– *Результати*

- стислий виклад результатів (резюме);
- інформація про дані відповідно до протоколу випробувань;
- наведення результатів досліджень, включаючи методи розрахунків та статистичної обробки;
- оцінка та обговорення результатів і, при необхідності, висновки.

– *Зберігання*

- місце зберігання всіх зразків, проб, вихідних даних та заключного звіту.

**Зберігання даних досліджень та матеріалів.** Принципи GLP стосовно записів наведено в табл. 10.

До обов'язків керівника випробувань входить забезпечення своєчасного надходження до архіву всіх матеріалів випробування. Це повинно бути зазначене у звіті про випробування. Якщо матеріали випробувань зберігаються в різних архівах, а випробування підлягає регулярним перевіркам, може виникнути необхідність зведення всіх матеріалів в одне місце.

Відповідальність за безпечне утримання матеріалів випробувань перекладається з керівника випробування на керівника установи-виконавця, який повинен забезпечити наявність пер-

*Накопичення та зберігання записів і матеріалів*

<p><b>10.1</b> Такі матеріали повинні зберігатися в архівах протягом періоду, визначеного відповідними службами:</p> <ol style="list-style-type: none"> <li>1) протокол випробування, вихідні дані, зразки досліджуваних матеріалів, <b>контрольних</b> матеріалів і матеріалів порівняння, проби і звіт про <b>випробування</b> з кожного етапу;</li> <li>2) записи про всі інспекції, проведені відповідно до програми контролю якості, а також головний графік робіт;</li> <li>3) записи щодо кваліфікації, навчання, досвід і посадові обов'язки персоналу;</li> <li>4) запису і звіти про догляд та калібрування апаратури;</li> <li>5) атестаційні документи комп'ютеризованих систем;</li> <li>6) історичний файл усіх СОП;</li> <li>7) записи про моніторинг навколишнього середовища.</li> </ol> <p>Якщо необхідний термін зберігання матеріалів ще не минув, повинно документуватися місце їхнього зберігання. В разі знищення з якоїсь причини зразків та проб досліджуваних матеріалів, <b>контрольних</b> матеріалів і матеріалів порівняння до закінчення необхідного терміну зберігання, необхідно обґрунтувати і документувати цю процедуру. Зразки і проби досліджуваних матеріалів, <b>контрольних</b> матеріалів і матеріалів порівняння повинні зберігатися настільки довго, наскільки дозволяє їхня якість</p>
<p><b>10.2</b> Матеріали, що зберігаються в архіві, повинні бути індексовані для забезпечення систематизованого збереження та полегшення доступу до них.</p>
<p><b>10.3</b> До архівів має доступ лише затверджений адміністрацією персонал. Переміщення матеріалів усередині архіву та їх дістання з архіву повинно старанно реєструватися.</p>
<p><b>10.4</b> Якщо тест-системи не мають архіву, або використовуються тимчасові архіви, які не мають офіційної реєстрації, архів випробування повинен бути переміщений в архіви Замовника випробування.</p>

соналу, відповідального за безпеку архіву та упорядкування картотеки. Термін збереження матеріалів в архіві повинен відповідати вимогам регулюючих органів або визначатися керівником установи, яка проводила випробування.

**Зберігання та пошук.** Архів повинен бути сконструйований та обладнаний у відповідності з вимогами щодо розміщення та надійного зберігання вказаних нижче матеріалів:

- протоколів випробування;
- вихідних даних;
- заключного звіту;
- звітів про інспекторські перевірки установи (лабораторії) та аудити випробувань, проведені відповідно до програми забезпечення контролю якості;
- зразків та проб.

З метою поліпшення упорядкованого зберігання та забезпечення швидкого пошуку матеріалів, що зберігаються в архіві, вони мають відповідним чином кодуватися. Доступ до архіву повинен мати лише персонал, уповноважений керівником установи. Передача матеріалів до архіву та за його межі повинна відповідним чином фіксуватися.

**Термін зберігання.** Відповідні регулюючі органи визначають термін збереження вказаних нижче матеріалів випробувань:

- протоколу випробувань, вихідних даних, зразків, проб та заключного звіту з кожного випробування;
- документації про всі інспекторські перевірки та аудити, проведені в межах програми забезпечення контролю якості;
- короткої інформації про кваліфікацію, освіту, досвід та функціональні обов'язки персоналу;
- документації та звітів про обслуговування і калібрування устаткування;
- архівного файлу стосовно СОП.

Зразки та проби повинні зберігатися протягом терміну, який дозволяє здійснювати їх якісну оцінку.

Якщо установа, яка проводить випробування, або лабораторія, що уклала договір з архівом, згортають свою діяльність без визначення юридичного спадкоємця, архів необхідно передати Замовнику випробування.

### КОРОТКОТРИВАЛІ ВИПРОБУВАННЯ

Згідно положень ОЕСР принципи GLP стосовно будь-якого окремого виду випробувань є загальними. Досвід моніторингу відповідності принципам GLP, накопичений країнами-членами ОЕСР, стосується, головним чином, довготривалих випробувань на токсичність. Але, оскільки питанню відповідності принципам GLP ОЕСР щодо короткотривалих випробувань з боку керівних органів та уповноважених з проведення моніторингу відповідності міжнародним правилам приділяється підвищена увага, за основу взято загально визнані існуючі методики та технології.

Короткострокові біологічні випробування включають визначення гострої токсичності, дослідження мутагенних властивостей та екотоксикологічні випробування.

Фізико-хімічні випробування – це короткотривалі дослідження, випробування або вимірювання, які за терміном не перевищують один робочий тиждень. При проведенні їх застосовуються поширені методи (напр., ті, що наведено в посібниках з проведення випробувань згідно вимог ОЕСР), а отримані легко відтворювані результати часто виражені простими числовими (цифровими) значеннями або словесними виразами.

Короткотривалі фізико-хімічні випробування включають, але не обмежуються, дослідженням хімічних властивостей, визначенням точки плавлення, тиску пару, коефіцієнту заломлення, вибухових властивостей та інших подібних випробувань, для яких існують посібники з випробувань. Проте, регулюючими органами в країнах-членах ОЕСР чітко визначено, які з цих випробувань повинні подаватись їм на розгляд з приводу відповідності принципам GLP. Такі розділи принципів GLP згідно ОЕСР потребують більш точного визначення їх застосування щодо короткотривалих випробувань. Розділи правил GLP, що не потребують пояснень, у даному матеріалі не повторюються. Примітки до принципів GLP подані для подальшого керівництва і правильного їх розуміння.

**Обов'язки керівника установи (лабораторії).** Керівник установи (лабораторії), яка проводить випробування, повинен перед початком кожного випробування призначити відповідального виконавця – спеціаліста відповідної кваліфікації, освіти та досвіду роботи.

*[Прим.] Питання призначення відповідального виконавця є основним стосовно забезпечення належного планування випробування, його проведення та одержання звіту за його результатами. При призначенні спеціаліста на посаду відповідального виконавця, можливо, варто надавати більше значення його досвіду роботи, ніж освіті.*

**Програма контролю якості.** Установа (лабораторія), яка проводить випробування, повинна мати документально оформлену програму забезпечення контролю якості для гарантії того, що випробування проводяться відповідно до принципів GLP.

*[Прим. 1] Всі рекомендації «програми забезпечення контролю якості» повинні трактуватися з посиланням на принципи GLP згідно вимог ОЕСР та погоджувальний документ організації ОЕСР про забезпечення контролю якості і GLP. Що стосується фізико-хімічних випробувань, то визнано, що інші опубліковані стандарти (наприклад, ISO 9000 серії) трактують термін «забезпечення контролю якості» по-різному.*

*[Прим. 2] Документація стосовно програми забезпечення якості досліджень повинна включати опис уживаних термінів перевірок (інспекцій) «безпосередні перевірки випробування», «інспекції лабораторій, що проводять випробування», «перевірки процесів випробувань», як визначено в погоджувальному документі ОЕСР № 4 «забезпечення контролю якості та GLP». Ці визначення приводяться нижче:*

– «Безпосередні перевірки випробувань»: вони розписані відповідно хронології даного випробування; звичайно, спочатку визначаються критичні фази випробування.

– «Інспекції лабораторій, що проводять випробування»: вони не стосуються контролю спеціальних випробувань, але охоплюють загальні приміщення та види діяльності всередині лабораторії (устаткування, технічне обслуговування, комп'ютерні системи, навчання, вплив на навколишнє середовище, експлуатація, калібрування і т.д.)

– «Перевірки процесів випробувань»: вони також проводяться незалежно від спеціальних випробувань, а здійснюються для контролю та спостереження за процесами, що повторюються і, як правило, проводяться вибірково.

Обов'язки персоналу служби контролю якості повинні включати, але не обмежуватися, такими функціями:

– переконатися, що протокол випробування та СОП доступні персоналу, який проводить випробування;

– забезпечити, щоб протокол випробування та СОП перевірялися під час періодичних інспекцій лабораторії, яка проводить випробування, та/або в ході аудиту випробування в процесі його виконання. Записи про такі процедури повинні зберігатися.

*[Прим.] Внаслідок повторності виконання та рутинного характеру деяких стандартних короткострокових випробувань у погоджувальному документі ОЕСР про забезпечення контролю якості і GLP було визнано, що персоналу служби контролю якості не варто проводити індивідуальну перевірку кожного подібного випробування. У цих випадках кожне випробування може піддаватися інспекції процесів випробування, що є складовою програми контролю якості. Частота таких інспекцій повинна бути точно визначеною у схвалених службою контролю якості СОП, якими враховано кількість, частоту та/або складність проведених у лабораторії випробувань. СОП повинні також гарантувати, щоб такі інспекції процесів випробування проводилися регулярно.*

– готувати та підписувати висновок, який повинен включатись до заключного звіту з позначенням дати проведених інспекцій та дати виявлених фактів невідповідності принципам GLP, про які повідомлено керівнику установи (лабораторії) та відповідальному виконавцю.

*[Прим.] У випадках, коли індивідуальні безпосередні перевірки випробування не проводяться, у висновку про забезпечення контролю якості повинно бути чітко описано, які види перевірок були проведені і коли. Висновок про забезпечення контролю якості повинен вказувати, що заключний звіт випробування підлягав аудиту.*

**Установа (лабораторія).** Для забезпечення вимог виконання випробувань та максимального запобігання ситуацій, які могли б несприятливо вплинути на достовірність результатів випробування установа (лабораторія), яка проводить дослідження, повинна мати приміщення відповідних розмірів, конструкції та розташування. Конструкція лабораторії, що проводить випробування, повинна забезпечувати необхідний ступінь поділу різноманітних видів діяльності для гарантії належного проведення кожного виду випробування.

*[Прим.] Головним чином викликає побоювання стосовно можливості забруднення тест-системи при використанні біологічних систем у випробуваннях *in vitro*. У лабораторіях повинні бути передбачені приміщення та розроблені процедури, які б наочно попереджали та/або дозволяли здійснювати контроль за таким потенційним забрудненням.*

**Прилади.** Інструментальні засоби, що використовуються при проведенні випробувань, необхідно періодично перевіряти, чистити, обслуговувати та калібрувати у відповідності до СОП. Необхідно зберігати записи про такі процедури.

*[Прим.] Калібрування повинне, де необхідно, забезпечувати фіксацію вимірів згідно до основних фізичних величин, які підтримуються відповідними національними органами. Інструментальні засоби (прилади) варто періодично перевіряти на предмет точності вимірів. Речовини, що використовуються для калібрування, варто розглядати як еталонні субстанції, які, проте, не потрібно зберігати.*

**Фізичні/хімічні тест-системи.** *[Прим.] Варто звернути увагу на деякий збіг між вимогами для «Фізичних/хімічних тест-систем», викладених у розділі 5.1.1 Принципів GLP ОЕСР, та ви-*

могами для «інструментальних засобів» (розділ 4.1.1). Очевидно, цей збіг не має будь-якого практичного значення для випробувань даного типу. Інструментальні засоби (прилади), що застосовуються у фізичній/хімічній тест-системі, повинні періодично перевірятися, чиститися, обслуговуватися і калібруватися відповідно до СОП (Розділ 4.1.2 Принципи GLP).

**Біологічні тест-системи.** Необхідно створити та підтримувати належні умови для утримання, обробки та догляду за тваринами, рослинами, мікроорганізмами, а також іншими клітинними і субклітинними системами з метою забезпечення належної якості даних.

Крім того, умови повинні відповідати національним регламентуючим вимогам стосовно ввозу, збору, догляду та використанню тварин, рослин, мікроорганізмів, а також інших клітинних та субклітинних систем.

Вперше отримані тест-системи тваринного або рослинного походження необхідно ізолювати до одержання результатів оцінки стану їх життєздатності. Якщо має місце незвична смертність або захворюваність, дана партія не повинна використовуватися у випробуваннях і, при необхідності, повинна бути знищена із застосуванням гуманних методів. Необхідно вести записи про джерело, дату надходження та умови надходження тест-систем.

Тест-системи тваринного, рослинного, мікробного та клітинного походження необхідно акліматизувати до середовища, де мають проводитись випробування протягом відповідного терміну до їх початку.

[Прим. 1] *Інформація про тест-систему: Необхідно вести документи, що містять записи про ріст, життєздатність та відсутність заражень партій тест-систем in vitro. Важливо, щоб походження та умови зберігання тест-системи для випробувань in vitro були документовані.*

[Прим. 2] *Першочерговою характеристикою тест-системи для випробувань in vitro є гарантія її чистоти, тобто тест-система відповідає опису, визначеному протоколом випробування. Це можна забезпечити, наприклад, за допомогою періодичного контролю генетичних показників, каріотипів або дослідження мікоплазми.*

[Прим. 3] *Ізолювання тест-систем: У випадку проведення короткострокових біологічних випробувань ізолювання тест-систем тваринного та рослинного походження може бути непотрібним. СОП, що застосовуються в лабораторії, повинні містити інформацію стосовно оцінки стану тест-систем (напр., історія створення та наступного розвитку колонії, постачальник тест-систем, спостереження, серологічна оцінка).*

[Прим. 4] *Контроль за факторами, здатними негативно вплинути на достовірність результатів випробувань in vitro: Повинні бути гарантії того, що вода, скляний посуд та інше лабораторне оснащення не містять речовин, які можуть зашкодити проведенню випробування. Для досягнення цієї мети до протоколу випробування варто включити препарат порівняння.*

[Прим. 5] *Характеристика культуральних середовищ: Повинна вестися відповідна документація щодо типів середовищ, інгредієнтів та номерів партій середовищ (напр. антибіотики, сироватки тощо). СОП повинні гарантувати правильність готування та прийнятність таких середовищ.*

[Прим. 6] *Застосування тест-системи: При певних обставинах деякі країни-учасники ОЕСР допускають повторне використання тварини або одночасне випробування кількох речовин на одній тварині. Питання, що викликає побоювання з погляду принципів GLP, полягає в тому, що в усіх випадках необхідно зберігати повну документацію про використання тварини раніше, а також фіксувати це в заключному звіті. Також необхідно документально підтверджувати, що такі дії не перешкоджають одержанню правильної оцінки речовин, що випробовуються.*

**Речовини, що випробовуються, та препарати порівняння.** Кожна речовина, що випробовується, та препарат порівняння повинні бути відповідним чином позначені (наприклад, код, хімічний абстрактний номер (ХАН), назва). В межах кожного випробування необхідно позначати кожну партію досліджуваної речовини або препарату порівняння, як-от вказувати номер партії, чистоту, склад, концентрацію та інші характеристики.

Для усіх видів випробувань потрібно мати інформацію про стабільність речовин, що випробовуються, та препаратів порівняння за даних умов зберігання. Якщо досліджувана речовина

вводиться в тому чи іншому середовищі, необхідно розробити СОП для визначення її однорідності та стабільності в даному середовищі.

[Прим. 1] Для кожної партії досліджуваної речовини, а також препарату порівняння має бути інформація стосовно їх тотожності. Рекомендується, щоб такі дані було отримано відповідно до принципів GLP, що сприяло б їх визнанню всіма країнами-членами ОЕСР. На ранніх стадіях розробки препаратів допускається визначення їх аналітичної характеристики після проведення біологічних випробувань. Проте, перед початком випробування має бути надано певну інформацію щодо хімічної будови речовини, що випробовується.

[Прим. 2] Стабільність речовин, що випробовуються, та препаратів порівняння, в залежності від умов їх зберігання, рекомендується, при необхідності, визначати відповідно до принципів GLP, що сприяло б визнанню отриманих даних всіма країнами-членами ОЕСР.

[Прим. 3] Стосовно вимог до визначення концентрації, стабільності та гомогенності досліджуваної речовини у певному середовищі в різних країнах-членах ОЕСР існують значні розходження. Крім того, у певних короткочасних біологічних випробуваннях не завжди можна провести такі аналізи одночасно. Для деяких з них, якщо проміжок часу між підготовкою та застосуванням звичайно стабільної речовини складає лише декілька хвилин, може бути недоцільним визначення стабільності. З цих причин досить важливим є точне визначення та затвердження вимог до проведення аналізу у протоколі випробування, а також чітке висвітлення їх у заключному звіті.

[Прим. 4] Не ясно, що мається на увазі під визначенням «випробування, при яких досліджувана речовина випробовується більше чотирьох тижнів». Проте звичайна інтерпретація цього визначення стосується періоду експозиції.

[Прим. 5] Дані, стосовно пунктів 2, 3 та 4 розділу «Характеристика» субстанцій, що випробовуються, та препаратів порівняння за принципами GLP (вище) будуть невідомими, якщо для визначення таких даних проводилися фізико-хімічні випробування.

**Стандартні операційні процедури (СОП).** [Прим.] Наочні приклади, приведені в розділі «Застосування» у частині «тест-система», відносяться в основному до біологічних тест-систем і тому можуть не мати значення в контексті фізико-хімічних випробувань. До обов'язків керівника установи (лабораторії), що проводить випробування, входить забезпечення наявності відповідних СОП.

**Протокол випробувань.** Перед початком кожного випробування необхідно скласти протокол його проведення в письмовій формі.

[Прим.] Якщо в лабораторії часто виконуються деякі короткострокові випробування або серія таких випробувань, може бути доцільним підготувати єдиний загальний протокол випробувань, що містить більшу частину загальної інформації, необхідної для такого протоколу, заздалегідь затвердженої керівником установи (лабораторії), яка проводить випробування, відповідальним виконавцем, а також персоналом служби контролю якості.

Спеціальні додатки до протоколу випробувань (напр., додатки, що включають докладну характеристику субстанції, що випробовується, дату початку випробування) повинні складатися як додатковий документ, який слід лише підписати з наведенням дати призначеному відповідальному виконавцю. Комбінований документ – загальний протокол випробування та спеціальні додатки до нього, – є протоколом випробування. Важливо, щоб такі додатки негайно надавалися керівництву лабораторії та персоналу служби контролю якості.

[Прим.] Повний зміст протоколу випробування (тобто зміст загального плану випробування і спеціальних додатків) повинен відповідати вимогам, викладеним у принципах GLP згідно ОЕСР, за винятком наступного:

Протокол випробування повинен містити, але не обмежуватися, такою інформацією:

- визначення випробування, речовини, що випробовуються, та препарату порівняння;
- описова назва;
- характер та мета випробування;

[Прим.] Це може знадобитися, якщо дана інформація не наведена в описовій назві.

- визначення речовини, що випробовується, за кодом або назвою (IUPAC; хімічний абстрактний номер тощо);
- препарат порівняння, який буде використовуватися;
- вихідні дані (де це потрібно);
- обґрунтування вибору тест-системи;
- характеристика тест-систем (вид, штам/підштам, джерело постачання, номер, маса, стать, вік тощо);
- спосіб введення та обґрунтування вибору;
- рівні доз та/або концентрацій, частота, тривалість введення;
- докладна інформація стосовно протоколу експериментів, включаючи хронологічний опис процедури випробування, усі методи, матеріали та умови, тип і частоту проведення аналізів, вимірів, спостережень та випробувань, що будуть виконуватися.

[Прим.] Наведені вище пункти можуть не знадобитися при проведенні фізико-хімічних випробувань.

[Прим.] Відомості можуть, як правило, наводитися в стислій, резюмованій формі з посиланням на відповідні СОП або посібники з проведення випробувань.

**Звіт про результати випробувань.** [Прим.] Якщо короткострокові випробування виконуються з використанням загальних протоколів випробування, може виявитися необхідним скласти «Стандартизовані заключні звіти», що містять велику частину загальної інформації, необхідної для таких звітів та заздалегідь затвердженій керівництвом лабораторії, яка проводить випробування, відповідальним виконавцем. Спеціальні доповнення до таких звітів, (наприклад властивості субстанції, що досліджується, та отримані цифрові результати) можуть готуватися як додатковий документ, що потребує лише датованого підпису відповідального виконавця. Неприйнятним є використання «стандартизованого заключного звіту» у випадку, коли протокол випробування переглядається або доповнюється до або під час проведення випробування, якщо тільки «стандартизований заключний звіт» відповідно не доповнюється.

[Прим.] Зміст повного заключного звіту (тобто «стандартизований заключний звіт» та спеціальні доповнення до нього) повинен відповідати вимогам, викладеним у принципах GLP згідно ОЕСР, за винятком наступного:

Заключний звіт повинен містити, але не обмежуватися такою інформацією:

- назва випробування, речовини, що випробовується, та препарату порівняння;
- описова назва;
- назва речовини, що випробовується, за кодом або назвою (IUPAC; хімічний абстрактний номер тощо);
- назва препарату порівняння за хімічною назвою;
- характеристика речовини, що випробовується, включаючи чистоту, стабільність та однорідність (гомогенність).

[Прим.] Інформація може виявитися не потрібною, якщо випробування виконується з метою визначення вказаних даних.

– висновок;

висновок про забезпечення контролю якості, із зазначенням дат проведених перевірок (інспекцій) та дат виявлення будь-яких фактів невідповідності, про які було сповіщено керівника установи (лабораторії) та відповідального виконавця.

[Прим.] Може виникнути необхідність внести до висновку результати проведеної перевірки ходу виконання випробування. Висновок про забезпечення контролю якості повинен вказувати, що заключний звіт був перевірений. (Див. також примітку під назвою «Відповідальність персоналу служби контролю якості»).



## МОНІТОРИНГ ВІДПОВІДНОСТІ ВИПРОБУВАНЬ ПРИНЦИПАМ GLP

**Організація моніторингу.** Національна програма відповідності принципам GLP повинна бути належним чином затверджена і впроваджуватися юридично визначеним органом управління з відповідним штатом, що функціонує в межах певної адміністративної структури.

Держави, що запровадили принципи GLP, повинні:

– гарантувати, що національний орган, який проводить моніторинг відповідності GLP, безпосередньо відповідає за правильність підбору штату інспекторів, які повинні мати необхідну наукову або технічну кваліфікацію, і повністю відповідати за їх діяльність;

– публікувати документи, що стосуються порядку впровадження та затвердження принципів GLP у межах своїх територій;

– публікувати документи, що містять докладний опис здійснення національної програми моніторингу відповідності принципам GLP, включаючи інформацію про юридичну або адміністративну структуру, у межах якої функціонує дана програма, та посилання на опубліковані законодавчі акти, нормативні документи (кодекси, постанови, положення, інструкції, практичні керівництва тощо), навчальні посібники з проведення інспекцій та ін.;

– вести та зберігати записи про результати інспекції установ (лабораторій) щодо їх відповідності принципам GLP та аудиту випробувань.

Для сприяння міжнародному взаєморозумінню та забезпеченню міжнародних зв'язків необхідно інформувати ОЕСР та інші країни-члени ОЕСР (напр., згідно порядку обміну додатковою інформацією, запровадженого ОЕСР) про зміст, наявність та доступність документів з GLP із зазначенням адрес та телефонів національних органів, які проводять моніторинг GLP.

**Конфіденційність.** Національні органи, які проводять моніторинг відповідності правилам GLP, повинні мати доступ до важливої комерційної інформації і, за необхідності, запитувати ці важливі комерційні документи або звертатись до них для детального ознайомлення при виконанні своїх обов'язків.

Держави-члени ОЕСР повинні:

– забезпечувати зберігання конфіденційності не лише інспекторами, але і будь-якими іншими особами, які мають доступ до конфіденційної інформації під час проведення моніторингу відповідності принципам GLP;

– у випадках, коли комерційно важлива, а також конфіденційна інформація не вилучається, забезпечувати доступність звітів про інспекцію лабораторій і аудит випробувань лише уповноваженим органам, особам, зацікавленим у перевірці досліджень, а також спонсорам (замовникам) випробувань;

– на запит інших держав-членів ОЕСР повинні надаватися назви установ (лабораторій), які підлягають інспекторській перевірці в межах національної програми відповідності GLP, рівень їхньої відповідності принципам GLP та дати проведення перевірок.

**Навчання персоналу.** Національний орган, який проводить моніторинг відповідності GLP, повинен:

– *забезпечувати наявність адекватної кількості інспекторів*, що визначається:

- числом установ (лабораторій), включених до національної програми відповідності GLP;
- періодичністю перевірок з метою оцінки статусу відповідності установ (лабораторій) принципам GLP;

- кількістю та складністю випробувань, що проводяться даними установами (лабораторіями);
- кількістю спеціальних інспекцій або перевірок, ініційованих уповноваженими органами.

– *забезпечувати необхідну кваліфікацію та підготовку інспекторів*

Інспектори повинні мати відповідну кваліфікацію та практичний досвід з ряду наукових дисциплін, які стосуються випробування хімічних речовин. Національний орган з моніторингу відповідності GLP повинен:

- забезпечувати проведення належного навчання інспекторів з урахуванням їхньої особистої кваліфікації та досвіду;

- заохочувати проведення консультацій, включаючи, за необхідності, спільну навчальну (стажувальну) діяльність із персоналом національних органів, які проводять моніторинг відповідності GLP інших країн-учасників ОЕСР з метою сприяння міжнародній гармонізації в галузі інтерпретації та застосування принципів GLP, а також моніторингу відповідності цим принципам.

- *забезпечувати відсутність фінансової або іншої зацікавленості персоналу, який проводить інспекцію в лабораторіях, що інспектуються, випробуваннях, що перевіряються, або фірмах, які є спонсорами (замовниками) таких випробувань.*

- *забезпечувати інспекторів документами, що засвідчують їх особу та посаду (напр., посвідчення особи).*

Інспектори можуть:

- працювати на постійній основі (бути в штаті національного органу, який проводить моніторинг відповідності GLP);

- працювати на постійній основі (бути в штаті органу, незалежного від національного органу, який проводить моніторинг відповідності GLP);

- працювати за контрактом або бути найнятим для проведення інспекцій лабораторій і перевірки випробувань національним органом, який проводить моніторинг відповідності GLP.

У двох останніх випадках національний орган, який проводить моніторинг відповідності GLP, повинен нести повну відповідальність за визначення статусу відповідності установ (лабораторій) принципам GLP та за якість аудиту випробувань, а також за прийняття будь-яких санкцій за результатами інспекцій установ або перевірки випробувань.

**Національна програма відповідності принципам GLP.** Метою моніторингу щодо відповідності принципам GLP є встановлення дотримання установами (лабораторіями) принципів GLP при проведенні випробувань, а також їхньої здатності гарантувати, що одержувані ними дані достовірні. Як зазначено вище, країни-учасниці ОЕСР повинні публікувати докладну інформацію щодо національних програм відповідності GLP. Такі програми повинні:

- *визначити задачі і сферу застосування програми.*

Національна програма відповідності GLP може охоплювати лише обмежений перелік речовин (напр., промислові хімічні речовини, пестициди, лікарські засоби тощо) або включати усі хімічні речовини. Завдання з моніторингу відповідності повинні бути визначені як стосовно категорій хімічних продуктів, так і методів їх тестування (напр., фізичні, хімічні, токсикологічні та/або екотоксикологічні).

- *визначити механізм, за яким лабораторії охоплюються цією програмою.*

Застосування принципів GLP стосовно вивчення потенційного впливу на людей та навколишнє середовище, отриманих з метою регламентації, є обов'язковим. Необхідно забезпечити механізм контролю установою (лабораторією) відповідності принципам GLP із залученням відповідного національного органу, який проводить моніторинг дотримання GLP.

- *надавати інформацію про види інспекцій лабораторій та/або аудит випробувань.*

- національна програма відповідності GLP повинна включати: регулярні інспекції лабораторій – тобто плановий моніторинг лабораторій (як правило, один раз на два роки). Вона включає як загальну інспекцію лабораторії, так і обмежену перевірку завершених випробувань та тих, що знаходяться в стадії виконання;

- спеціальні інспекції лабораторій (аудити випробувань) на вимогу уповноваженого регулюючого органу – тобто на основі питань, які виникли при розгляді даних, що надійшли до регулюючого органу.

- *визначити повноваження інспекторів щодо доступу до лабораторій та необхідних даних.*

Як правило, інспектори не проникають в лабораторії всупереч бажанню керівництва лабораторії. Проте можуть виникнути обставини, за яких присутність інспектора в лабораторії та доступ до документів, наявних у лабораторії, необхідні для охорони здоров'я населення або довкілля. У зв'язку з цим доцільно визначити повноваження національного органу, який проводить моніторинг GLP, щодо дій у таких випадках.

– описувати процедуру інспекції лабораторії та перевірки випробувань для підтвердження відповідності принципам GLP.

У документації необхідно вказувати процедури, які будуть використовуватися для вивчення як організаційних процесів, так і умов, за яких плануються, здійснюються, контролюються та записуються випробування. Посібник з проведення таких процедур можна знайти в Інструкціях з проведення інспекцій лабораторій та перевірки випробувань (№ 3 даної серії ОЕСР з Принципів GLP та моніторингу відповідності).

– описувати дії, що здійснюються після завершення інспекції лабораторії і аудиту випробувань.

**Завершення інспекції установ та перевірки випробувань.** Після завершення інспекції лабораторії або перевірки випробування, інспектори повинні підготувати письмовий звіт про виявлені факти невідповідності принципам GLP.

У разі виявлення відхилень від принципів GLP, установи повинні під час або після закінчення інспекції лабораторій здійснити заходи щодо їх усунення. Відповідні дії повинні описуватися в документах, що видаються національним органом, який проводить моніторинг відповідності GLP.

При виявленні під час інспекції лабораторії або перевірки випробування незначних відхилень від принципів GLP від лабораторії можуть зажадати виправлення таких порушень. Через певний проміжок часу інспекцію необхідно повторити, щоб переконатися у проведенні відповідних заходів.

Якщо під час перевірки не виявлено будь-яких відхилень (або вони були незначними), то уповноважений національний орган, який проводить моніторинг, може:

– зробити висновок, що лабораторія була проінспектована, в результаті чого встановлено, що вона працює відповідно до принципів GLP. У висновку обов'язково зазначається дата інспекції і, якщо необхідно, перелік перевірених випробувань, які виконувались на той час лабораторією. Такий висновок можна використовувати для надання інформації в національні органи, які проводять моніторинг відповідності GLP в інших країнах;

– і (або) надати регулюючому органу, який замовив перевірку випробування, детальний звіт про виявлені недоліки.

Якщо під час інспекції лабораторії або перевірки випробування виявлені серйозні відхилення від принципів GLP, то заходи, які застосовуватиме національний орган, що проводить моніторинг відповідності GLP, будуть залежати від характеру та ступеню невідповідності та юридичних і (або) адміністративних санкцій, передбачених національною програмою відповідності GLP. Заходи, що можуть проводитися, включають (але не обмежуються) так:

– підготовку висновку з детальним описом виявлених недоліків або помилок, які можуть вплинути на обґрунтованість (достовірність) випробувань, проведених у лабораторії;

– призупинення (припинення) перевірки лабораторії (аудиту випробування) у лабораторії і, де це адміністративно можливо, усунення лабораторії з національної програми відповідності GLP. Крім того, можливе виключення даної лабораторії з реєстру лабораторій, які підлягають інспектуванню на предмет відповідності GLP;

– надання висновку, який детально описує відхилення, до звітів про випробування;

– дії через судові органи у випадках підтверджених порушень принципів GLP, якщо національні юридичні/адміністративні процедури дозволяють їх чинити.

У випадку виявлення серйозних відхилень, які можуть вплинути на певні випробування, національний орган, що проводить моніторинг відповідності GLP, повинен розглянути необхідність інформування регулюючих або національних органів інших країн, які проводять моніторинг, про виявлені факти.

**Процедура подачі апеляції.** Проблеми або розбіжності в поглядах між інспекторами і керівництвом лабораторії зазвичай вирішуються в ході інспекції лабораторії або перевірки випробування. Проте не завжди можна дійти згоди. Тому повинна бути розроблена процедура, за допомогою якої лабораторія може зробити подання щодо результатів інспекції лабораторії

або перевірки випробування з питань моніторингу відповідності принципам GLP та/або стосовно санкцій, які має здійснити уповноважений орган, що проводить моніторинг.

### ***Перевірка установ (лабораторій) та випробувань***

Перевірка дотримання принципів GLP може проводитися в будь-якій лабораторії, де виконуються дослідження речовин стосовно безпечності для людини та довкілля з метою їх регламентації. До обов'язків інспекторів може входити перевірка даних про фізичні, хімічні, токсичні для людини чи навколишнього середовища властивості речовини або препарату. У деяких випадках інспекторам може знадобитися допомога експертів з визначених дисциплін.

Наявність великої кількості лабораторій (стосовно як їх розміщення, так і структури управління) поряд із розмаїттям випробувань, з якими зіштовхуються інспектори, обумовлює необхідність оцінювати ступінь відповідності принципам GLP на підставі їх власної думки. Проте, інспектори мають прагнути узгодженого підходу в оцінці того, чи досягнуто адекватний рівень відповідності кожному з принципів GLP у конкретному випадку для даної лабораторії або даного випробування.

У наступних розділах наведено керівництво з різних аспектів структури лабораторії, яка проводить випробування, включаючи її персонал та використовувані методики, які мають також перевірятися інспекторами. У кожному розділі міститься формулювання мети, а також ілюстративний перелік пунктів, за якими здійснюється перевірка лабораторії. Цей перелік неповний і не повинен розцінюватися як обов'язковий.

Інспекторів не повинна цікавити актуальність або мета випробування, а також інтерпретація отриманих у ході випробування даних з погляду небезпеки для здоров'я людини або для навколишнього середовища. Розгляд цих питань входить до обов'язків регулюючих органів, яким надаються дані з метою прийняття регламентуючих рішень.

Перевірка лабораторії та випробувань неминуче порушує нормальну роботу в лабораторії. Тому інспектори повинні виконувати свою роботу за ретельно складеним планом і, по можливості, враховувавши побажання керівництва лабораторії стосовно часу відвідин лабораторії.

Під час проведення перевірки лабораторій і випробувань інспектори повинні мати доступ до конфіденційної комерційної інформації. Тому потрібна гарантія з їх боку, що така інформація буде проглядатися лише персоналом, який має на це особливий дозвіл. Відповідальність інспекторів стосовно цього буде встановлюватися в рамках проведення національної програми контролю за дотриманням принципів GLP.

**Попередня перевірка.** Метою попередньої перевірки є ознайомлення інспектора з лабораторією, яку планується перевірити, щодо структури керівництва, розміщення та облаштування будівель, а також області випробувань.

Перед проведенням перевірки лабораторії або випробування інспектори повинні ознайомитися з лабораторією, яку вони будуть відвідувати. Варто переглянути будь-яку існуючу документацію про лабораторію. Вона може включати звіти про попередні перевірки, схеми організації лабораторії, розміщення устаткування, звіти про випробування, протоколи, автобіографії основних співробітників. У цих документах може міститися така інформація:

- тип, розмір та розташування лабораторії;
- сфера випробувань, із якими може зіткнутись інспектор у ході перевірки;
- структура управління лабораторією.

Інспектори повинні, зокрема, звернути увагу на недоліки, виявлені в ході проведення попередніх перевірок лабораторії. Якщо лабораторія раніше не перевірялась, то для отримання необхідної інформації можна провести попередню перевірку.

Слід попередити керівництво лабораторії про дату і час прибуття інспектора, мету візиту і тривалість його перебування на території. Це дозволить керівництву забезпечити наявність необхідного персоналу і відповідної документації. У випадках, коли необхідно переглянути

документи або записи, варто сповістити про це заздалегідь для того, щоб вони були надані на час перевірки лабораторії.

**Проведення наради перед перевіркою.** Метою попередньої наради є інформація керівництва та персонал лабораторії про причину запланованої перевірки лабораторії або випробування, а також визначити лабораторні приміщення та випробування, обрані для перевірки, зазначити, які документи і персонал можуть знадобитися під час проведення перевірки.

Перед візитом слід обговорити з керівництвом лабораторії адміністративні та практичні деталі перевірки лабораторії або випробування. На нараді перед початком перевірки інспектори повинні:

- вказати мету та задачі відвідин;
- описати документацію, яка знадобиться для перевірки лабораторії, наприклад, перелік проведених і завершених випробувань, протоколи випробувань, СОП, звіти про випробування гощо. Варто також узгодити можливість доступу до копій відповідних документів і, при необхідності, віддати розпорядження щодо надання таких копій;
- уточнити або запросити інформацію щодо структури і персоналу лабораторії;
- запросити інформацію стосовно паралельного проведення випробувань, які повинні відповідати принципам GLP, і випробувань, до яких принципи GLP не застосовуються;
- попередньо визначити відділи лабораторії, у яких буде проводитися перевірка;
- зазначити документи і зразки, які знадобляться для завершених чи незавершених випробувань, обраних для перевірки.

Перед початком проведення перевірки інспектору бажано встановити контакт із службою контролю якості при даній лабораторії.

Відповідно до загального правила проведення перевірки лабораторії інспекторів повинен супроводжувати співробітник служби контролю якості.

Інспектори можуть звернутися з проханням про надання їм окремого приміщення для перегляду документів та виконання своїх обов'язків.

**Організація випробування і персонал.** Мета: визначити, чи забезпечена лабораторія достатньою кількістю кваліфікованих співробітників, обслуговуючого персоналу та допоміжних служб для виконання випробувань у необхідному обсязі; чи відповідає вимогам структура організації діяльності лабораторії; чи введена керівництвом практика стосовно навчання персоналу і контролю за його здоров'ям відповідно до випробувань, що проводяться у лабораторії.

Інспектор може попросити керівництво підготувати деякі документи, наприклад:

- плани поверхів;
- схеми адміністративної та наукової організації лабораторії;
- автобіографії основних співробітників, які брали участь у проведенні випробувань, обраних для перевірки;
- перелік незавершених та завершених випробувань із зазначенням їх типу, термінів початку та закінчення, предмету вивчення, способу введення, прізвища відповідального виконавця;
- документ, у якому описано практику проведення навчання персоналу і контролю за його здоров'ям, якщо таку практику введено;
- облікові документи стосовно навчання персоналу;
- предметний покажчик СОП, що використовуються в лабораторії;
- особливі СОП, які стосуються випробувань або методик, що перевіряються;
- список відповідальних виконавців, визначених для перевірки.

Інспектор повинен, зокрема, перевірити:

- список незавершених та завершених випробувань для визначення обсягу робіт, проведених у лабораторії;
- ідентифікаційні дані і кваліфікацію відповідальних виконавців, керівника служби контролю якості та інших основних співробітників;
- наявність СОП для відповідних об'єктів випробування.

## Належна лабораторна практика (GLP)

Програма контролю якості. Метою даної перевірки є визначення задовільності механізмів, які використовує керівництво для гарантії проведення лабораторних випробувань у відповідності з принципами GLP.

Інспектор може поцікавитись системами та методами, які застосовуються службою контролю якості для перевірки випробувань та мати змогу спостерігати за ходом їх виконання, а також системою реєстрації спостережень, що здійснюються службою контролю якості при проведенні перевірок. Інспектори повинні перевірити:

- кваліфікацію керівника служби контролю якості та її співробітників;
- незалежність функціонування служби контролю якості від співробітників, які брали участь в проведенні випробувань;
- планування та проведення перевірок службою контролю якості, контролювання найважливіших етапів випробування, наявність достатніх ресурсів для виконання перевірки тощо;
- можливість вибіркового контролю випробувань у випадках, коли вони нетривалі і тому контроль кожного такого випробування є недоцільним;
- ступінь контролю практичних етапів даного випробування з боку служби контролю якості;
- процедури перевірки службою контролю якості заключного звіту з метою забезпечення його узгодженості з первинним матеріалом;
- надання керівництву лабораторії звітів служби контролю якості стосовно проблем, які можуть вплинути на якість та достовірність випробування;
- заходи, що здійснюються службою контролю якості при виявленні порушень;
- роль служби контролю якості у випадках, коли випробування або його фрагмент проводяться на контрактній основі в інших лабораторіях;
- роль служби контролю якості в перевірці та перегляді СОП.

**Лабораторія.** Метою даної перевірки є визначення відповідності розміру, розташування, організації та оснащення лабораторії вимогам до проведення випробувань.

Інспектор повинен перевірити:

- наявність та розташування приміщень лабораторії, їх здатність забезпечити зберігання досліджуваних речовин, утримання та спостереження за тваринами, розміщення кормів тощо, які використовуються в одному випробуванні, та запобігання змішування їх з об'єктами, які використовуються в інших дослідженнях;
- застосування адекватних методів контролю за умовами в спеціальних приміщеннях, наприклад, у кімнатах, де проводяться експерименти на тваринах, перевіряються біологічні системи, зберігаються досліджувані речовини тощо;
- наявність додаткових службових приміщень і, при необхідності, застосування заходів боротьби з комахами.

**Утримання, розміщення та догляд за біологічними тест-системами.** За мету ставиться визначення наявності в лабораторії додаткових приміщень та забезпечення умов утримання, розміщення та догляду за тваринами або іншими біологічними тест-системами, якщо такі використовуються при проведенні випробувань, виключення можливості дії стресу або іншого негативного впливу на біологічні тест-системи і, відповідно, на якість результатів випробування.

У лабораторії можуть проводитися випробування, що потребують використання різноманітних видів тварин і рослин, а також мікробних або інших клітинних та субклітинних систем. Тип тест-систем, що використовуються в експерименті, визначає умови її утримання, розміщення та догляду, адекватність чого є предметом перевірки інспектором. Залежно від типу тест-системи інспектор визначає доцільність перевірки наступного:

- адекватності наявних служб догляду за тест-системами, що використовуються при проведенні даного випробування;
- наявності належних умов для забезпечення карантину для отриманих ззовні тварин та рослин;

- дотримання ізоляції тварин (або, при необхідності, інших елементів тест-системи) хворих або таких, що можуть бути хворими або переносниками захворювань;
- проведення адекватного контролю за здоров'ям, поведінкою або іншими критеріями, що застосовуються для оцінки стану даної тест-системи, з відповідною ресстрацією результатів спостереження;
- належного обслуговування та ефективної роботи устаткування для підтримки умов середовища у приміщенні, необхідних для відповідної тест-системи;
- дотримання достатньої чистоти кліток, стелажів, резервуарів та інших ємкостей для розміщення тварин і допоміжного устаткування;
- забезпечення проведення аналізів для перевірки умов утримання тест-систем;
- наявності служби для вилучення та знищення відходів тест-систем, ефективність їх функціонування та здатність зведення до мінімуму можливості зараження гельмінтами, присутності запахів, небезпеси захворювання та забруднення навколишнього середовища;
- наявності приміщень для зберігання кормів для тварин або подібних матеріалів для тест-систем; чи не використовуються ці площі для зберігання інших матеріалів (досліджувані речовини, хімікати для боротьби з комахами або дезинфікуючі засоби), які мають бути ізольовані від приміщень розміщення тварин або інших біологічних тест-систем;
- захищеності кормів та підстилки для тварин від зараження, забруднення або псування внаслідок дії несприятливих умов довкілля.

**Апаратура, матеріали, реактиви та зразки.** Мета: визначення наявності в лабораторії необхідної для роботи апаратури та відповідності її кількості та розміщення задачам випробувань, що проводяться, а також адекватності позначень та правильності використання та зберігання матеріалів, реактивів та зразків.

Інспектор повинен переконатись, що:

- вся апаратура утримується в чистоті і робочому стані;
- ведеться облік роботи устаткування, його обслуговування, перевірки та калібрування;
- матеріали і хімічні реактиви адекватно промарковані та зберігаються при відповідній температурі в межах терміну придатності. На етикетці до реактиву необхідно вказувати джерело його одержання, назву, концентрацію, а також іншу необхідну інформацію;
- зразки адекватно промарковані із зазначенням виду тест-системи, назви випробування, походження і дати взяття;
- апаратура та матеріали, що використовуються, не впливають на тест-систему.

**Тест-системи.** Дана перевірка здійснюється з метою: визначити, чи існують в лабораторії адекватні процедури для утримання та контролю за тест-системами (напр. хімічними, фізичними, клітинами, мікробами, рослинами, тваринами), необхідними для проведення випробувань. Інспектор повинен перевірити:

- чи визначалась стабільність досліджуваних речовин та речовин порівняння, зазначених у протоколі випробування під час проведення досліджень;
- чи існують СОП у даній лабораторії і дотримуються їх положення в роботі;
- чи документується та зберігається в архіві первинний матеріал, отриманий в автоматизованих системах у виді графіків, кривих, комп'ютерних роздруківок;

**Біологічні тест-системи.** З урахуванням відповідних аспектів стосовно вищесказаного щодо утримання, розміщення та захисту біологічних тест-систем, інспектор повинен пересвідчитись, що:

- тест-системи відповідають зазначеним у протоколі випробування;
- тест-системи з метою їх ідентифікації відповідним чином марковані;
- у разі необхідності тварини маркіровані особливим чином, що дозволяє їх ідентифікувати протягом проведення всього випробування;
- місця розміщення або утримання тест-систем адекватно промарковані із зазначенням всієї необхідної інформації;

– існує необхідне розмежування випробувань, що проводяться на однакових видах тварин (або на одній і тій самій біологічній тест-системі), але з використанням різних речовин для випробування;

– існує належне розмежування між видами тварин (та іншими біологічними тест-системами) як у просторі, так і в часі;

– утримання біологічної тест-системи відповідає умовам, зазначеним у протоколі випробування або в СОП стосовно таких чинників як температура, цикли освітленості приміщень тощо;

– зареєстровані відомості про джерело отримання, обробку, розміщення та догляд, оцінку стану здоров'я щодо відповідної тест-системи;

– забезпечено збереження записів про обстеження, карантин, захворюваність, смертність, поведінку, діагностику та лікування тварин і рослинних тест-систем або інші аспекти, що мають відношення до кожної біологічної тест-системи;

– існують положення про відповідне видалення тест-систем після закінчення випробування.

**Досліджувані речовини і препарати порівняння.** Метою даної перевірки є визначити, чи передбачені в лабораторії процедури, призначені, по-перше, для перевірки відповідності досліджуваних речовин та речовин порівняння специфікаціям стосовно визначення, активності, якісного і кількісного складу, по-друге, для адекватного отримання і зберігання досліджуваних речовин та речовин порівняння.

Інспектор повинен перевірити:

– наявність СОП щодо реєстрації отримання, обробки, відбору зразків, використання та зберігання досліджуваних речовин та речовин порівняння;

– адекватність позначок на ємкостях для зберігання досліджуваних речовин та речовин порівняння;

– відповідність умов зберігання для збереження концентрації, чистоти та стабільності досліджуваних речовин та речовин порівняння;

– існування СОП для визначення тотожності, чистоти, складу, стабільності, а також збереження від забруднення досліджуваних речовин та речовин порівняння;

– збереження записів про склад, характеристику, концентрацію та стабільність досліджуваних речовин та речовин порівняння;

– застосування методів визначення однорідності та стабільності сумішей, які містять досліджувані речовини та речовини порівняння;

– наявність маркування смістей, які містять суміші (або розчини) досліджуваних речовин та речовин порівняння, а також збереження записів про однорідність і стабільність їх компонентів;

– забезпечення відбору зразків кожної партії досліджуваних речовин та речовин порівняння для аналізу з метою визначення їх стабільності протягом необхідного терміну, якщо випробування триває більше 4 тижнів;

– наявність методів змішування речовин для запобігання помилок при ідентифікації або перекресному забрудненні.

**Стандартні операційні процедури (СОП).** Мета: визначити, чи є в лабораторії опис СОП для усіх важливих аспектів діяльності лабораторії, враховуючи те, що застосування написаних СОП є одним з найважливіших способів контролю роботи лабораторії. Вони мають безпосереднє відношення до стандартних елементів випробувань, що проводяться у лабораторії.

Інспектор повинен перевірити:

– наявність в усіх підрозділах лабораторії відповідно засвідчених копій СОП;

– існування процедури перевірки та відновлення СОП;

– порядок затвердження з фіксованою датою внесення поправки та змін в СОП;

– збереження в архіві всіх варіантів СОП;

– наявність СОП для наступних видів діяльності (але не обмежуються ними):

- отримання, ідентифікація, маркування, обробка, відбір зразків, використання та зберігання досліджуваних речовин та речовин порівняння;



- обслуговування, очищення та калібрування вимірювальної апаратури та пристроїв для контролю за умовами у приміщенні;
- підготовка реактивів та форм дозування;
- ведення записів, складання звітів, зберігання та пошук записів і звітів;
- створення і контроль за умовами у приміщеннях, де знаходяться тест-системи;
- отримання, передача, розміщення, характеристика, ідентифікація та стан тест-систем;
- стан тест-систем до, під час і наприкінці проведення випробування;
- знищення тест-систем;
- застосування засобів для боротьби з комахами та миючих засобів;
- операції в межах програми контролю якості.

**Проведення випробування.** Перевірка проводиться для того, щоб переконатися в наявності написаного протоколу випробування, а також, що протокол та проведення випробування відповідають принципам GLP.

Інспектор повинен перевірити, що:

- протокол випробування підписаний відповідальним виконавцем;
- будь-які правки в протоколі випробування та доповнення підписані і датовані;
- при необхідності, зазначена дата схвалення спонсором протоколу випробування;
- вимірювання, спостереження і перевірки відповідають протоколу випробування і відповідним СОП;
- результати цих вимірювань, спостережень і перевірок записуються відразу, швидко, акуратно і розбірливо, підписуються і датуються;
- будь-які зміни в первинному матеріалі, включаючи дані, що зберігаються в комп'ютері, не суперечать попереднім записам із зазначенням причини зміни, підписані і датовані;
- дані, отримані за допомогою комп'ютера, або ті, що зберігаються в ньому, адекватно ідентифіковані і прийнято заходи для захисту від несанкціонованого внесення змін або знищення даних;
- комп'ютерне програмне забезпечення, що застосовується при проведенні випробування, є надійним, точним і може бути перевірене;
- будь-які очікувані події, зареєстровані в первинному матеріалі, були вивчені й оцінені;
- результати, подані в звітах про випробування (проміжних або заключних), є послідовними і повними, а також вірно відображають первинний матеріал.

**Звіт.** Мета: визначити, чи складені заключні звіти відповідно до принципів GLP.

Якщо є заключний звіт, то інспектор повинен перевірити, чи:

- він підписаний і датований відповідальним виконавцем та іншими основними науковими співробітниками;
- відповідальний виконавець підписав заяву про взяття на себе відповідальності за достовірність випробування з підтвердженням того, що воно проводилося відповідно до принципів GLP;
- у звіт включено підписаний і датований висновок служби контролю якості;
- усі правки та доповнення внесено лише відповідальними особами;
- у звіті зазначено місце збереження (архів) всіх проб, зразків та первинного матеріалу.

**Зберігання документації.** Мета: визначити, чи зібрані в лабораторії відповідні записи і звіти та чи прийняті відповідні заходи для безпечного зберігання матеріалів випробувань.

Інспектор повинен перевірити:

- архів, де зберігаються протоколи випробувань, первинні матеріали, заключні звіти, зразки та проби;
- процедуру пошуку архівних матеріалів;
- забезпечення доступу до матеріалів архіву лише уповноважених осіб та наявність списку співробітників, які мають доступ до первинних матеріалів, слайдів тощо;
- наявність обліку взятих з архіву та повернутих до архіву матеріалів;

– зберігання записів та матеріалів протягом визначеного терміну та захищеність їх від втра-ти або пошкодження вогнем, несприятливим умовами навколишнього середовища тощо.

**Перевірка випробування.** Перевірка лабораторій, як правило, включає, крім усього іншо-го, обмежену перевірку випробувань. Вона може полягати в частковому аналізі матеріалів щодо незавершених та завершених випробувань. Якщо уповноважені регулюючі органи ви-магають проведення особливої перевірки випробувань, то тоді ретельно вивчається вся на-явна документація про випробування. Внаслідок наявності великої кількості типів випро-бувань, що можуть перевірятися, застосовуються загальні правила, а інспектори й інші особи, які беруть участь у перевірці випробувань, повинні керуватися власною думкою сто-совно характеру й обсягу їхньої перевірки. Метою перевірки є відновлення ходу випробу-вання на підставі його протоколу з використанням відповідних СОП, первинного та архів-ного матеріалів.

Інколи проведення ефективної перевірки випробування, наприклад, у випадках, коли необ-хідно дослідити ділянки тканини під мікроскопом, інспекторам може знадобитися допомога інших експертів.

При проведенні перевірки випробування інспектор повинен:

– мати відомості (прізвище, перелік функціональних обов'язків, дані про освіту, досвід ро-боти) про деяких співробітників, які приймали участь у проведенні випробування, наприклад, відповідального виконавця та основних наукових співробітників. Це дало б змогу впевнитись, що у випробуванні брала участь достатня кількість співробітників високої кваліфікації і з дос-відом роботи у відповідних галузях;

– визначити окремі одиниці апаратури або спеціального обладнання, які використовували-ся під час проведення випробування, та дослідити записи про калібрування, перевірку і тех-нічне обслуговування обладнання;

– переглянути звіти про стабільність досліджуваних речовин, проведення їх аналізу;

– спробувати шляхом опитування співробітників з'ясувати розподіл функцій між окремими особами, які беруть участь у випробуванні, щоб переконатися, що вони мали достатньо часу для виконання завдань, зазначених протоколом або у звіті про випробування;

– одержати копії всіх документів, що стосуються методів контролю або складової основної частини випробування, включаючи:

– протокол випробування;

– СОП, що використовуються і після завершення випробування;

– лабораторні журнали, зошити, файли, робочі блокноти, роздруківки даних, що зберігають-ся в електронному вигляді тощо;

– заключний звіт.

Під час перевірки випробувань, у яких використовувалися тварини (гризуни та інші ссавці), інспектори повинні простежити шлях визначеної кількості окремих тварин з моменту їх над-ходження в лабораторію і до розтину. Варто звернути особливу увагу на записи стосовно:

– ваги тварин, вживання їжі/води, дози та шлях введення препарату тощо;

– клінічних спостережень і даних, виявлених при розтині;

– даних клінічних лабораторних аналізів;

– патоморфології.

Після завершення перевірки лабораторії або випробування, інспектор повинен підготувати-ся до обговорення результатів перевірки з представниками лабораторії, а також скласти пись-мовий звіт, тобто звіт про інспекторську перевірку.

Під час перевірки може бути виявлено ряд незначних відхилень від принципів GLP, зазви-чай, недостатньо серйозних, щоб вилунити на достовірність випробувань, проведених у лабо-раторії. У таких випадках інспекторові доцільно у своєму звіті зазначити, що лабораторія пра-цює згідно принципів GLP, відповідно до критеріїв, встановлених (національним) органом, який проводить контроль за дотриманням цих принципів. Водночас, керівництву лабораторії

варто надати докладну інформацію про всі виявлені розбіжності та одержати запевнення, що буде розпочато заходи щодо усунення цих відхилень. Можливо, інспектору потрібно буде повторно відвідати лабораторію через деякий час, щоб переконатися в тому, що було дійсно вжито всіх необхідних заходів.

Якщо під час перевірки лабораторії або випробування виявлено серйозні відхилення від принципів GLP, що, на думку інспекторів, могло б вплинути на достовірність результатів даного випробування або інших випробувань, проведених у лабораторії, інспектор повинен подати звіт у національний орган, який контролює дотримання принципів GLP. Заходи, які застосовуватимуться цим органом, будуть залежати від характеру та ступеню невідповідності, а також юридичних і/або адміністративних положень, передбачених програмою відповідності принципам GLP.

Якщо перевірка випробування проводилася на прохання регламентуючого органу, необхідно підготувати повний звіт про усі виявлені факти і направити його через відповідний національний орган, який контролює дотримання принципів GLP, зацікавленому у перевірці регламентуючого органу.

## **АЛЬТЕРНАТИВНІ МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ ТОКСИЧНОСТІ ЛІКАРСЬКИХ ЗАСОБІВ. ЗАСТОСУВАННЯ ПРИНЦИПІВ GLP**

Результати вивчення гострої токсичності, у першу чергу, використовуються як основа для класифікації хімічних речовин та рекомендацій відносно умов їхнього виробництва, транспортування і застосування, а також в інших цілях, наприклад, для визначення моделей токсичного впливу, створення рівнів доз для інших досліджень і, виходячи з виявлених токсичних ефектів, розробки медичних заходів при отруєнні. Визначення гострої токсичності речовини, включає оцінку загальних токсичних ефектів як при одноразовому, так і багаторазових її введеннях протягом 24 год. Досліджувані речовини можуть вводитися різноманітними способами (орально, інгаляційно, зовнішньо або парентерально). Дослідження гострої системної токсичності включає визначення летальних та нелетальних доз речовин.

Останнім часом методичні підходи щодо визначення летальних доз зазнають критики певною мірою самими токсикологами, які докладають значні зусилля до впровадження альтернативних методів дослідження з метою полегшення страждань лабораторних тварин, кількісного зниження або повного виключення використання їх в експерименті [1, 2]. При цьому висловлюються полярно протилежні думки: одні, з огляду на існування різноманітних типів клітин, а, отже, проведення великої кількості токсикологічних досліджень, вважають, що впровадження подібних систем дослідження є нереальним; інші, навпаки, розглядають можливість створення систем дослідження, які можна було б використовувати при роботі з основними типами хімічних сполук з урахуванням механізмів їхньої токсичності. Питання про те, наскільки дослідження без використання тварин зможуть зменшити або навіть замінити дослідження гострої токсичності *in vivo*, залишається остаточно невирішеним. Координатором розробки і практичного впровадження методів *in vitro* з дослідною метою на території Європи є Європейський центр валідації альтернативних методів. Головним завданням цієї організації є сприяння науковим та офіційним узгодженням у сфері застосування альтернативних методів у біології, що дозволяє зменшити або виключити використання лабораторних тварин.

Слід зазначити, що, незважаючи на велику кількість досліджень з цитотоксичної дії речовин, досі приділяється недостатньо уваги щодо впровадженню цих результатів у практику. Особливо це стосується прогнозування потенційної токсичності хімічних речовин для цілісного організму.

Передумовою до впровадження будь-яких досліджень системної токсичності *in vitro* повинно бути розуміння концепції активної концентрації та реальної дози. Недопустимою є думка, що концентрації речовин, уведених у культуру клітин, будуть прийнятні для організму в ціло-

му. Необхідно пам'ятати, що за дії на живі об'єкти достатньо високих концентрацій речовин завжди будуть мати місце токсичні ефекти, тому в матеріалах досліджень необхідно вказувати кількісні значення концентрацій досліджуваних речовин. У першу чергу це стосується їхніх абсолютних значень, а також співвідношення концентрацій, здатних викликати загальну, селективну або специфічну цитотоксичну дію.

Якщо мова йде про хімічну речовину, яка, як правило, має цитотоксичні властивості, то цілком виправданими є вивчення їх в дослідях *in vitro*. Виявлено [3–8] високий ступінь кореляції між даними цитотоксичності речовин, отриманих з використанням недиференційованих ліній клітин *in vitro* та показниками  $LD_{50}$ . Проте, досить часто гостра токсичність на рівні цілісного організму може бути обумовлена механізмами, які не можуть бути враховані в дослідженнях на рівні клітини, наприклад, при вивченні токсичності речовин, що здійснюють свою токсичну дію шляхом впливу на специфічні рецептори, внаслідок кумуляції в цілісному організмі, а також в результаті утворення токсичних метаболітів. Тому в таких випадках необхідно шукати інші шляхи вирішення даної проблеми [9]. Водночас, між результатами досліджень, проведених *in vitro* та *in vivo*, може бути досягнуто високий ступінь кореляції. Проте при вивченні токсичності нової речовини дані *in vitro* повинні бути обов'язково підтверджені дослідом *in vivo*.

Варто підкреслити, що при трактуванні результатів таких досліджень необхідно брати до уваги і біокінетичні фактори, які впливають на взаємодію між клітинами та досліджуваними речовинами, а отже, здатні ускладнювати інтерпретацію даних, отриманих в дослідях *in vitro*, та прогнозування потенційної токсичності речовин *in vivo*.

**Типи цитотоксичної дії.** Якщо давати визначення загальній цитотоксичності як несприятливій дії на структуру та/або властивості клітин, що впливає на виживання, проліферацію та/або функціонування останніх, то на клітинному рівні можна виділити три основних типи токсичних ефектів:

- ушкодження мембран та цитоскелета клітин;
- порушення процесів метаболізму, синтезу, деградації та виходу клітинних компонентів;
- порушення регуляції іонного складу та ділення клітин.

Застосування альтернативних методів вивчення гострої токсичності потребує тонкого розуміння і точного трактування понять типів цитотоксичної дії:

- **загальна** – включає один або більше вищезгаданих процесів, коли всі типи досліджуваних клітин виявляють подібну чутливість;
- **селективна** – спостерігається у випадку, коли різні типи клітин відрізняються за чутливістю щодо токсичного агента, наприклад, в результаті впливу процесів біотрансформації, зв'язування із специфічними рецепторами або дії спеціальних механізмів;
- **специфічна функціональна** – має місце у випадку, коли дія токсичного агента не впливає на функціонування безпосередньо клітин, але є критичною для цілого організму, наприклад, через вплив на взаємозв'язок клітина-клітина в результаті синтезу, звільнення гормонів і трансмітерів, пригнічення кінетичних реакцій або специфічних процесів транспорту.

Одночасно всі три типи цитотоксичної дії речовин виявляються при використанні методів визначення гострої системної токсичності в дослідях *in vivo*. Поряд із цим, гостра токсична дія на організм може бути результатом впливу позаклітинних процесів, що необхідно враховувати при проведенні досліджень *in vitro*.

**Вплив біокінетичних параметрів.** На рівень токсичності хімічних речовин в умовах *in vivo* значний вплив справляють процеси їх всмоктування, розподілу, біотрансформації та виведення з організму. Тому виділяють різноманітні види біокінетики (токсикокінетики) сполук. Як же у такому випадку враховувати біокінетичні фактори при дослідженнях гострої токсичності в умовах *in vitro*?

При вивченні ефектів хімічних речовин в умовах *in vitro* визначаються їх критичні концентрації (наприклад,  $EC_{50}$  і  $EC_{10}$ ), що характеризують дію хімічних речовин у спеціальних умовах експерименту *in vitro* [10]. Для правильності оцінки дії критичних концентрацій препаратів *in*

*in vitro* рекомендується порівнювати їх з даними критичних концентрацій, що діють в місці зв'язування речовин (клітини-мішені) при реєстрації гострої токсичності в умовах *in vivo*. Це концентрації, які зумовлюють граничну токсичність сполук, проте вивчаються вони досить рідко. Концентрація речовини в місці її зв'язування не є ідентичною тій, що циркулює в плазмі крові. Через присутність різноманітних факторів, що впливають на біокінетику, концентрація речовини в клітині-мішені в багатьох випадках помітно відрізняється від концентрації, визначеної в плазмі. Незважаючи на це, використання показника критичної концентрації речовини в плазмі крові є цілком припустимим для проведення порівняльної характеристики даних, отриманих *in vivo* та *in vitro*.

Як правило, показники ефективності препаратів в умовах *in vivo* є критичними дозами, визначеними в експерименті на цілому організмі і виражаються в одиницях маси (об'єму) на 1 кг маси тіла. Ефективність речовин в умовах *in vitro* розраховується за їх концентрацією (напр., мг/мл культурального середовища). Очевидно, що ці показники ефективності не можуть порівнюватися безпосередньо, оскільки в такому випадку не враховується вплив біокінетичних факторів. Незважаючи на це, через нестачу необхідних даних біокінетичних параметрів речовин, що досліджуються, звичайно використовуються прямі порівняння  $LD_{50}$  та  $EC_{50}$ , як параметрів оцінки даних, отриманих в дослідженнях *in vitro* для прогнозування гострої токсичності в умовах *in vivo*.

Для опису взаємозв'язку між  $EC_{50}$  та  $LD_{50}$  часто застосовується лінійний регресійний аналіз [8], тобто лінійна залежність між цими параметрами цілком припустима. Проте вона може мати місце, якщо: а) усі досліджувані хімічні речовини в спеціальних умовах подібні за механізмом дії (напр., викликають гостру токсичність в умовах *in vivo* за механізмом, аналогічним такому в експериментах *in vitro*); б) досліджувані хімічні речовини виявляють аналогічні біокінетичні властивості *in vivo* та *in vitro* (напр., подібність біокінетики, що впливає на токсичну концентрацію речовин у місцях їх зв'язування, до процесів, які визначають параметри токсичності відносно цілісного організму). У зв'язку з впливом токсикодинаміки та токсикокінетики на зв'язування досліджуваних речовин результати лінійного регресійного аналізу неминуче демонструють значний розкид. Незважаючи на це, метод лінійного регресійного аналізу дозволяє виявити статистично значиму позитивну лінійну кореляцію між параметрами  $EC_{50}$  та  $LD_{50}$ . Інтерпретацію подібних результатів слід здійснювати з певною обережністю. Порівняння даних *in vivo* та *in vitro* шляхом встановлення кореляції між ними може бути досить успішним для відбору речовин на основі подібності механізму їх дії та біокінетичних параметрів. У цьому випадку лінійна кореляція може бути достатньо вираженою.

Таким чином, для одержання більш вірогідних результатів порівняння даних, отриманих у дослідях *in vitro* та *in vivo*, необхідно враховувати біокінетичні фактори.

**Біотрансформація.** Ксенобіотики можуть викликати токсичні реакції в організмі прямо або шляхом біотрансформації в печінці та інших тканинах. Тому необхідно враховувати всі можливі шляхи утворення метаболітів хімічних сполук. Одним із головних обмежень використання клітинних ліній для вивчення цитотоксичності є їхня низька спроможність до метаболізму. Тому дослідження такого типу варто проводити з використанням сполук, здатних створювати токсичні ефекти безпосередньо на клітинах. Отже, для сполук, токсичний ефект яких обумовлений дією реактивних метаболітів, дослідження *in vitro* з метою прогнозування їхньої токсичності в умовах *in vivo* будуть неточними.

Незважаючи на те, що значна кількість тканин може впливати на метаболічне перетворення ксенобіотиків, печінка є домінуючим органом, що здійснює біотрансформацію речовин. Ліпофільні ксенобіотики хімічно модифікуються в печінці в серії біотрансформаційних реакцій, відомих, як I та II фази, що підвищує їх поляризацію та розчинність і сприяє виведенню з організму. Якщо цього не відбувається, ліпофільні сполуки здатні накопичуватися в тканинах організму, у результаті чого можуть розвиватись явища інтоксикації. Протягом I фази біотрансформації хімічні речовини або продукти їхнього метаболізму досить часто, але не завжди,

зв'язуються з молекулами ендогенних речовин (глюкуронова кислота, глутатіон, сульфати, амінокислоти). У результаті цього утворюються легкорозчинні сполуки, які швидко виводяться з організму. II фаза біотрансформації часто характеризується обмеженням кількості ендогенних речовин, необхідних для з'єднання з вихідними хімічними сполуками або їхніми метаболітами, що утворились у I фазі. Головною ендогенною захисною системою є окисно-відновний цикл глутатіону, який у високих концентраціях присутній у клітинах ссавців і діє як нуклеофільний детоксикатор хімічних речовин і продуктів їх метаболізму.

Звичайно біотрансформація характеризує процес детоксикації, але існує багато прикладів, коли продукти метаболізму хімічних сполук, утворених в ході I фази біотрансформаційних реакцій, виявляються більш реактивними та токсичними у порівнянні з вихідними речовинами. Дія високореактивних метаболітів, серед інших факторів, залежить від періоду їх півжиття. До того ж, кон'югати II фази також здатні обумовлювати токсичні ефекти багатьох речовин. Отже, токсичність хімічних сполук залежить від балансу між реакціями I та II фаз метаболізму.

Висока здатність печінки до біологічного перетворення речовин дозволяє ефективно елімінувати токсичні сполуки, хоча досить часто вона сама стає мішенню токсичної дії. Відомо, що велика кількість хімічних речовин є індукторами гепатотоксичності.

Важливе значення печінки в здійсненні процесів метаболізму та утилізації токсичних сполук в організмі обумовлює впровадження експериментальних систем *in vitro*, пов'язаних з даним органом. Вони включають використання гомогенатів, субклітинних фракцій (напр., мікросом), долей печінки, суспензії свіжоізолюваних гепатоцитів, первинної моношарової культури гепатоцитів, гепатоцитів, які перевиваються, та клітинних ліній гепатоми [11]. Основною вимогою до вивчення процесів біотрансформації є використання систем *in vitro*, що зберігають здатність до метаболізму. Гомогенати печінки бідні на ферменти I фази біотрансформації. Вивчення метаболічних процесів і токсичності хімічних сполук на клітинах гепатоми обмежене тим, що вони недостатньо впливають на експресію багатьох процесів біотрансформації. Слід також враховувати нестабільність ферментів I і II фаз біотрансформації у свіжоізолюваних клітинах печінки та первинній культурі гепатоцитів різних видів тварин та людини.

Виявлення селективної токсичності речовин потребує проведення порівняльних досліджень на різноманітних типах клітин, включаючи гепатоцити. Більш того, може виникнути необхідність визначення в клітинах-мішенях токсичних метаболітів досліджуваних речовин. Це може бути досягнуто за допомогою: а) спільного культивування клітин, що здійснюють метаболізм та клітин-мішеней; б) експозиції гепатоцитів (як клітин, здатних до метаболізму) з досліджуваною речовиною з пастишим культивуванням у середовищі для культивування клітин-мішеней, що утворилося. Використання спільної культури гепатоцитів і клітин-мішеней дозволяє виявити: а) гепатозалежну цитотоксичність; б) порушення специфічних (не життєво важливих) функцій гепатоцитів; в) опосередковані метаболізмом ефекти на клітини-мішені [12–14].

**Розподіл речовин в умовах *in vitro* та *in vivo*.** Існують різноманітні підходи до оцінки впливу факторів біокінетики на екстраполяцію критичних концентрацій речовин, отриманих в експерименті *in vitro*, на їх критичні дози, розраховані на одиницю маси тіла.

Найбільш надійним засобом вирішення цього питання, безсумнівно, могло б бути моделювання біокінетичних процесів, засноване на фізіологічних методах [15]. Такий підхід досить складний і потребує глибоких знань про стан органів-мішеней в умовах *in vivo*, з одного боку, токсикокінетичних характеристик речовин, з іншого, тому не може застосовуватися для оцінки токсичності великої кількості хімічних сполук. Можна використовувати декілька, старанно відібраних в умовах *in vivo* біокінетичних параметрів (абсорбовані з кишечника фракції та їхній дійсний об'єм розподілу; оцінка дози препарату на одиницю маси тіла відповідно до його критичної концентрації, визначеної в експерименті *in vitro*, а також визначення концентрації речовини в плазмі крові згідно її доз, розрахованих на одиницю маси тіла) [16, 17]. Проте, для більшості хімічних речовин, за винятком фармакологічних засобів, інформація щодо біокінетичних параметрів в умовах *in vivo* є недостатньою.

Тест-системи в умовах *in vitro* та моделі експериментів *in vivo* можуть використовуватися як основа для екстраполяції ефективних концентрацій речовин, визначених в дослідях *in vitro*, на еквівалентні дози для цілого організму. Для здійснення цього необхідно мати, як мінімум, інформацію щодо: а) фізико-хімічних характеристик речовини (напр., рКа, ліпофільність, летючість); б) кількісної оцінки зв'язування з білками; в) основних характеристик системи *in vitro* (напр., концентрація клітин у культуральному середовищі, концентрація білка в клітині, співвідношення об'ємів клітина-середовище, концентрація альбуміну в культуральному середовищі). Крім того, необхідно здійснювати математичне моделювання, що дозволяє розраховувати еквівалентні дози препарату на одиницю маси тіла.

Очевидно, що застосування лише даного методу екстраполяції концентрацій є недостатнім. Дослідження повинні бути проведені з урахуванням інших важливих факторів, які, в першу чергу, стосуються пасивного розподілу речовин. Тому необхідно розробляти методи, які б дозволяли визначати та враховувати вказані фактори.

**Етапи дослідження гострої токсичності.** В даний час може бути запропонована послідовність трьох основних етапів досліджень, які використовуються для прогнозування гострої токсичності в умовах *in vivo*.

На першому етапі повинна визначитися загальна цитотоксична дія на основі оцінки пригнічення проліферації клітин. Кращим матеріалом для цього є недиференційована лінія клітин, здатна до трансформації та швидкого поділу. При цьому клітини повинні підлягати впливу речовин протягом експоненційної фази свого росту, а тривалість впливу повинна бути принаймні втричі більшою за час, протягом якого відбувається подвоєння кількості клітин. На цьому етапі досить корисним може бути визначення цитолетальних концентрацій речовин для клітин, що не діляться.

Метою другого етапу дослідження є не лише виявити наявність специфічної гепатотоксичної дії, але і визначити роль біотрансформації в цитотоксичності досліджуваних речовин. У принципі, це може бути здійснено шляхом використання спільного культивування гепатоцитів, залучених до метаболізму речовин, та проліферуючих клітин, використаних на першому етапі дослідження, а також клітин, які розглядають у ролі мішеней дії досліджуваної речовини. Така двокомпонентна система з культурою гепатоцитів щура та проліферуючих клітин ЗТЗ в ролі клітин-мішеней [13, 14]. Інша можлива двокомпонентна система полягає у використанні фільтруючих вставок у чашки культивування для поділу систем «метаболізму» та «відповіді» або застосування методики обертової камери [18]. Третьою можливою системою могла б стати попередня експозиція гепатоцитів із досліджуваною речовиною з наступним культивуванням у тому ж культуральному середовищі клітин-мішеней.

Системи досліджень, використані на третьому етапі, повинні забезпечити одержання інформації, що стосується селективної цитотоксичної дії речовин, відмінної від специфічної гепатотоксичності, яка повинна визначатись на II етапі, а також вивчення наявності будь-яких інтерференцій з важливими, але не життєво визначальними специфічними функціями клітин. На даному етапі може бути використано велику кількість тест-систем *in vitro* (диференційовані клітини різноманітних потенційних органів та систем, мішеней дії хімічних речовин, напр., клітин нервової системи, серця, нирок тощо) [19].

Наочним прикладом системи тестування на III етапі досліджень є оцінка пригнічення процесу скоротливості в культурі клітин скелетних м'язів щура. Механізмом скорочення цих клітин, що можна спостерігати за допомогою мікроскопу, є спонтанна електрична активність збудливих мембранних структур, яка визначається їх реактивністю під впливом відомих хімічних сполук [20, 21] та виявляється:

- зміною мембранного потенціалу спокою та порога збудливості;
- модифікацією функцій різноманітних іонних каналів;
- інгібуванням  $\text{Na}^+ \text{K}^+ \text{-ATPази}$ ;
- наявністю так званих, «*змінної*» або «*стабільної*» мембранних активностей.

Існують докази, що подібні системи досліджень дозволяють визначити кардіотоксичні та нейротоксичні ефекти хімічних сполук, що виявляються в порушеннях дії електрично збудливих мембран. Залишається відкритим важливе питання стосовно інших типів клітин, які можуть бути включені до системи досліджень на III етапі.

**Дослідження in vitro та класифікація хімічних речовин.** Ключовим завданням застосування даних досліджень є визначення співвідношення умовних ефективних концентрацій речовин in vitro та ефективних доз цих речовин in vivo. Це обумовлює важливість біокінетичних факторів, які необхідно враховувати при побудові математичної моделі прогнозування, адекватної задачі вивчення хімічних речовин у дослідах in vitro незалежно від етапу дослідження. З огляду на це, запропонована схема класифікації та маркірування хімічних речовин відповідно до їхньої гострої токсичності (рис. 1).



Рисунок 1. Схема дослідження потенційної гострої токсичності хімічних речовин з метою їх класифікації.

Перший етап дослідження загальної цитотоксичності необхідно проводити, як описано вище. На основі даних фізико-хімічних властивостей досліджуваних речовин та токсикокінетичних параметрів, визначених в дослідах in vivo і in vitro, отримані результати дозволяють визначити ефективні дози, еквівалентні для цілого організму. Якщо за отриманими результатами речовина класифікується як «дуже токсична», то подальші дослідження не проводяться. У протилежному випадку варто переходити до другого етапу досліджень; в разі визначення речовини

як «дуже токсичної», дослідження закінчується на цьому етапі. Якщо ж ні, то необхідно проводити III етап випробувань, який дозволяє класифікувати речовину як: «дуже токсична», «токсична», «небезпечна» або «токсичність не визначається» згідно найменшого значення  $EC_{50}$ , визначеного на одному з вищевказаних трьох етапів дослідження.

Якщо за отриманими даними виявлено, що хімічна сполука належить до найнижчого класу токсичності (тобто «токсичність не визначається»), необхідно провести обмежені дослідження його токсичності в умовах in vivo для підтвердження отриманих даних. Експерименти на тваринах повинні підтвердити, що при оцінці токсичності речовини в умовах in vitro не відбулося можливого заниження параметрів його потенційної токсичності. Це може мати місце у випадку, якщо сполука діє за механізмами, які не реалізуються в умовах in vitro, або за наявності токсикокінетичних процесів, участь яких неможливо врахувати при проведенні досліджень in vitro.

**Принципи GLP стосовно альтернативних методів дослідження токсичності.** Принципи GLP з самого початку їх впровадження є регулюючими і не перетинаються з аспектами науки та технологій, але досить часто доповнюють останні. Чинні дотепер принципи GLP прийняті ОЕСР у 1997 році [22]. Вимоги національних програм щодо відповідності проведення доклінічних досліджень правилам GLP в різних країнах можуть дещо відрізнятись. Лабораторія може заявляти про формальну відповідність вимогам GLP, якщо вона працює на основі програми, розробленої національними моніторинговими організаціями по GLP за умов наявності



відповідного підтвердження цих організацій. Лабораторії, що працюють у рамках національних програм відповідності вимогам GLP, періодично відвідуються урядовими інспекторами, що проводять всебічну перевірку лабораторії, визначають ступінь її відповідності GLP [23].

При участі в дослідженні лабораторії, що знаходиться поза національною програмою відповідності GLP, формальний контроль якості дослідження може виявити невідповідність випробувань вимогам GLP. У даному випадку необхідно забезпечити надання національним моніторинговим організаціям по GLP необхідної інформації. У звітах про дослідження вказано, що випробування виконано лабораторіями без формального дотримання вимог GLP, а також визначено можливий вплив на достовірність результатів.

Установи (лабораторії) можуть проводити випробування, що належать до компетенції регулюючих органів стосовно GLP, а також дослідження, що їм не підпорядковуються (запровадження методів випробувань, фундаментальні дослідження тощо). Якщо обидва види досліджень проводяться на тих самих площах, вони підпорядковуються вимогам GLP. Основні відмінності полягають у зменшенні контролю за якістю «нерегульованих» досліджень та зниженні вимог щодо визначеної правилами GLP документації.

**Організація досліджень.** Сформульовані ОЕСР в 1981 році принципи GLP стосувались лише досліджень, розміщених локально (рис. 2). Цим терміном позначається ситуація, коли установа (лабораторія) та керівник дослідження розташовані в одному місці проведення всіх процедур. Керівник дослідження визначається як особа, відповідальна за загальне проведення дослідження. Відповідно до принципів GLP йому належить центральна роль у проведенні дослідження. У межах кожного локально розміщеного дослідження, що проводиться відповідно до правил GLP, існує один керівник, один протокол та один звіт про дослідження.

Досить часто дослідження в різних галузях, особливо це стосується визначення продуктів розкладу хімічних сполук у навколишньому середовищі (польові випробування), проводяться у формі **багатоцентрових досліджень**. Цей термін визначає дослідження, які розміщені в декількох географічно розділених місцях та/або в декількох організаціях, але виконуються під одноосібним керівництвом, тобто в межах кожного багатоцентрального дослідження, що проводиться відповідно до правил GLP, існує один керівник, один план та один звіт дослідження (рис. 3) [24, 25].

При проведенні багатоцентрових випробувань виникає проблема щодо можливос-

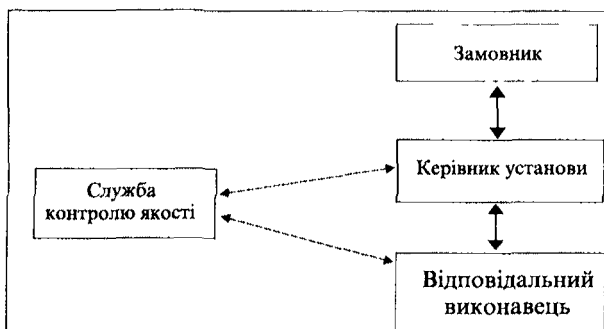


Рисунок 2. Організація локально розміщеного випробування.

Пунктирною лінією позначено участь персоналу служби контролю якості.

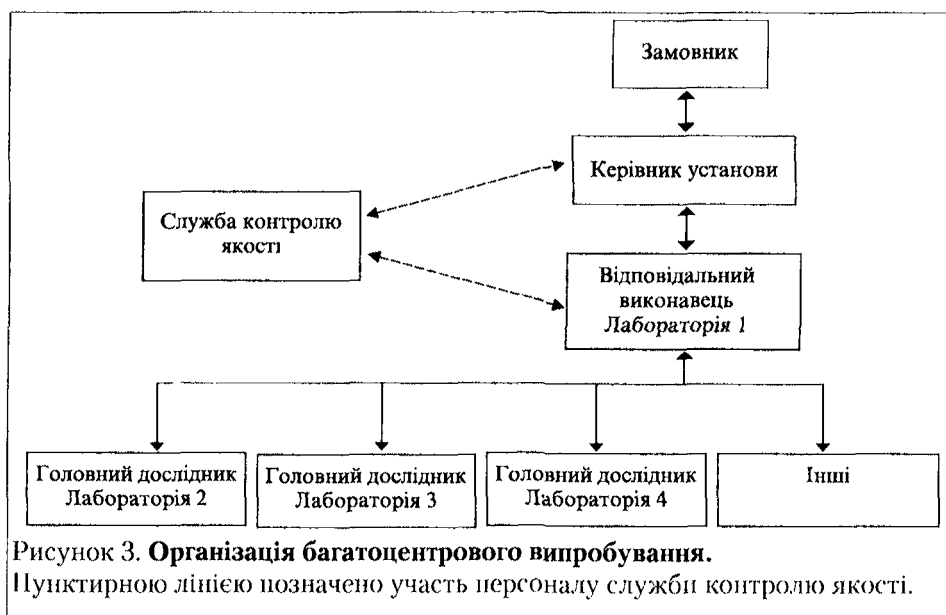


Рисунок 3. Організація багатоцентрового випробування.

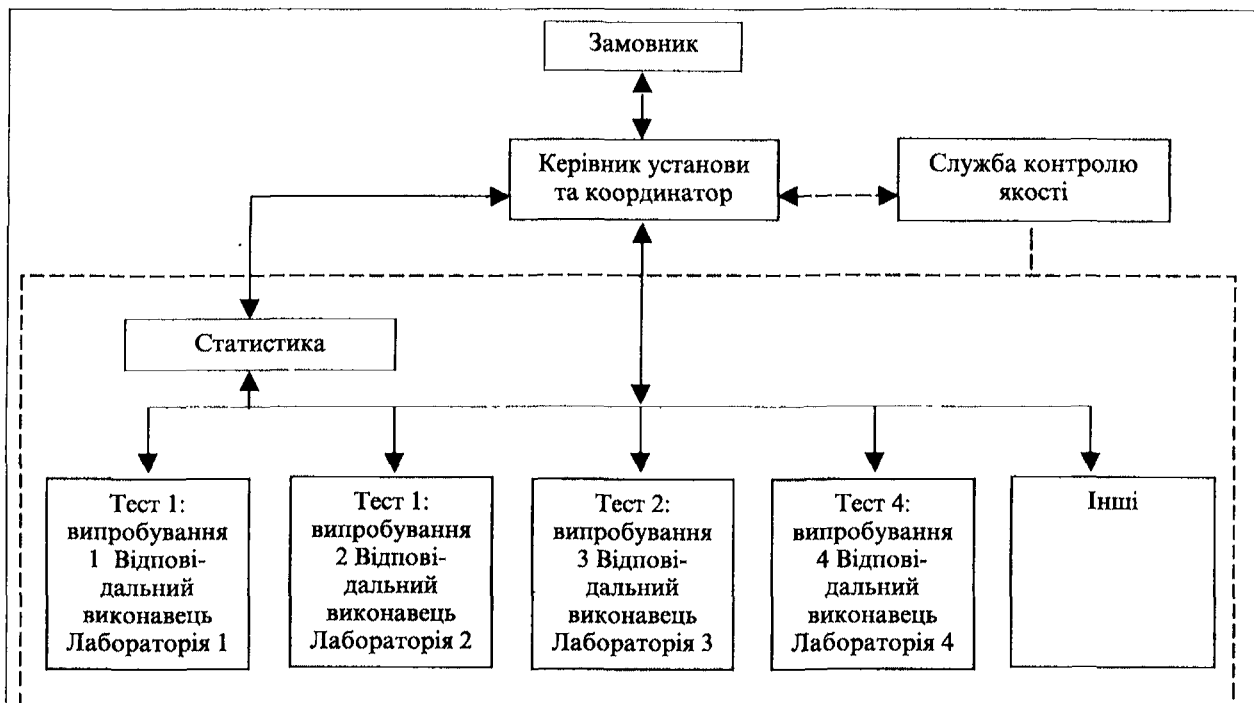
Пунктирною лінією позначено участь персоналу служби контролю якості.

ті керування окремими дослідженнями керівником та його відповідальності за проведення дослідження в цілому. Відповідно до принципів GLP, у цьому випадку вводиться статус головних дослідників окремих частин дослідження. Для багатоцентрових досліджень головний дослідник є особою, що діє від імені керівника дослідження і відповідає за проведення делегованої йому фази дослідження. Головний дослідник надає керівникові дослідження звіт про відповідну частину дослідження.

Складові дослідження (напр., міжлабораторні передатестаційні/атестаційні «сліпі» дослідження) можуть складатися з двох або більше випробувань відповідно для кожного компонента, що підлягає передатестації/атестації, причому кожне дослідження є незалежним та відділеним від інших. Таким чином, кожне дослідження повинно мати власного керівника дослідження, протокол дослідження та звіт про дослідження і проводитись у формі локального або багатоцентрового випробування (рис. 4). Термін «сліпе» дослідження означає, що керівник і персонал дослідження не мають повного детального опису об'єктів тестування у процесі проведення випробування, а також на етапах підготовки та завершення звіту.

Звіти про дослідження направляються незалежним структурам для аналізу даних, статистичного аналізу та підготовки остаточного звіту. Питання керування та звітності при проведенні складового дослідження будуть розглянуті далі.

Головним обов'язком керівника установи, що проводить випробування, є забезпечення дослідження достатньою кількістю кваліфікованого персоналу, приміщеннями, відповідним оснащенням, устаткуванням та матеріалами, необхідними для своєчасного та адекватного проведення дослідження, а при багатоцентрових дослідженнях – місце дослідження (розташування) фази (фаз) дослідження. Прізвище особи, що виступає в ролі керівника установи, яка здійснює випробування, згідно GLP, повинно бути задокументовано. Фактично на цьому рівні закріплюється його загальна відповідальність за забезпечення відповідності дослідження вимогам GLP. Для забезпечення урівноваженості програми та можливості її регулювання функції керівника уста-



**Рисунок 4. Організація GLP для складового випробування (включаючи передатестаційні/атестаційні випробування).**

Декілька співробітників служби контролю якості може бути включено до складового випробування. Пунктирною лінією позначено участь персоналу служби контролю якості.

нови, яка здійснює випробування, відповідального виконавця та служби контролю якості повинні здійснюватися різними особами. Функції керівника установи, яка здійснює випробування, відрізняються від обов'язків відповідального виконавця, який відповідає за загальне проведення багатоцентрового дослідження. Функції останнього будуть розглянуті нижче.

Відповідальний виконавець призначається керівником установи, яка здійснює випробування. У випадку заміни відповідального виконавця в процесі випробувань (напр., у зв'язку зі зміною роду його діяльності), керівник установи повинен детально документувати факт заміни, причини, що побудили до цього та прізвище особи, що заступила на його місце із зазначенням дати вступу заміни в силу. У план дослідження повинні бути внесені відповідні поправки, якими відображається така заміна, ставиться підпис новопризначеного відповідального виконавця, керівника установи та, у разі потреби, замовника.

Новопризначений відповідальний виконавець на момент початку роботи повинен визначити відповідність раніше проведених досліджень вимогам GLP, а у випадку виявлення будь-яких невідповідностей, вичерпно їх документувати.

У випадку багатоцентрових досліджень керівник установи повинен призначити головного дослідника, який має відповідну освіту, кваліфікацію та досвід, а також розуміння вимог GLP, достатнє для успішного керівництва певною фазою дослідження. Процедура заміни головного дослідника аналогічна процедурі заміни відповідального виконавця і здійснюється керівником установи.

Загальний протокол є документом, який забезпечує чітке розуміння процедур, які необхідно виконати, а також використання ресурсів. Він використовується для оцінки обсягу досліджень в цілому.

У загальному протоколі, як правило, має бути представлена інформація згідно пунктів:

- назва дослідження;
- тест-система та засоби випробувань;
- природа дослідження;
- прізвища відповідального виконавця та головних дослідників;
- терміни початку та закінчення дослідження.

Доцільно також включити в загальний протокол додаткову інформацію, напр., терміни надання звітів, передачі матеріалів до архіву тощо.

Загальний протокол повинен відображати загальні відомості про дослідження, а також особистість відповідального виконавця, тоді як протоколи досліджень, які розташовані в різних місцях, можуть включати лише локальні дані та напрямки робіт, а також містити відомості про головного дослідника.

Деякі лабораторії можуть проводити випробування, які згідно принципів GLP підлягають офіційній звітності, а також дослідження, що не підпорядковуються регулюючим щодо GLP органам (удосконалення методів, фундаментальні наукові дослідження тощо). Останні можуть також проводитися в рамках GLP, але за умов зменшення контролю якості та зниження вимог щодо визначеної GLP документації. Якщо лабораторія проводить обидва типи досліджень, у загальному протоколі необхідно вказати перелік досліджень, що не підлягають регулюванню правилами GLP. Принципи GLP щодо тест-систем наведено в табл. 5, яка містить деякі доповнення стосовно систем культури клітин та тканин. Вони визначають необхідність визначення походження цих систем, ступеня впливу випадкових агентів, а також умов їхнього вирощування. Такі тест-системи можуть вирощуватись та підтримуватись з метою збереження їхньої біологічної цілісності з метою використання в якості засобів дослідження.

Досить часто тест-системи *in vitro* не готують безпосередньо в установах, які проводять дослідження, а отримують з інших джерел (напр., клітинні лінії). У деяких випадках первинне виділення здійснюється за декілька декад до початку дослідження, у інших, особливо при роботі з клітинами та тканинами людини, дані про донора є недоступними для користувача тест-системи. Таким чином, установа, яка вирощує або постачає такі тест-системи, виступає в ролі

первинного джерела інформації про походження зразків та тканин. Вона повинна також надавати дані відповідних випробувань, які мають гарантувати відсутність у тест-системі випадкових агентів (різні види тварин та тканин), а також її чистоту. Важливо, щоб установи, які проводять дослідження, могли простежити шлях до безпосереднього джерела тест-системи. Надходження та розміщення тест-системи в установі (лабораторії), яка проводить дослідження, повинно бути документовано. Ці вимоги аналогічні документуванню походження та вихідного стану здоров'я тест-систем *in vivo*.

Тест-системи *in vitro*, особливо системи прокаріотів та еукаріотів, досить часто вирощують в установах, які проводять дослідження з метою їх накопичення для забезпечення безперервного одержання матеріалу. Оскільки при упорядкуванні протоколу передбачається наявність визначення стабільності тест-систем, вони повинні утримуватися відповідним чином для забезпечення їхньої стабільності протягом усього часу дослідження. Умови вирощування та утримання тест-систем мають враховуватись при плануванні дослідження, причому необхідно достатньо детально описувати критичні елементи підтримки їх стабільності.

Характеристика тест-систем *in vitro* має першорядне значення. Забезпечення необхідних умов для систем *in vitro* є більш важливим порівняно з експериментами *in vivo*. При цьому необхідно керуватися положеннями:

1) забезпечення адекватних умов збереження, розміщення та догляду за тест-системами з метою забезпечення якості одержуваних даних (використання високоякісних прийомів одержання клітинної та тканинної культур, якісні технології антисептики, що є істотною частиною роботи *in vitro*);

2) обов'язкова характеристика тест-систем, яка визначає вимоги до системи, і дозволяє оцінити будь-які зміни її стану;

3) новоотримані тест-системи повинні перевірятися щодо ступеня чистоти, відсутності забруднень, придатності для дослідження та ідентичності. Доки система не буде задовольняти необхідним критеріям, вона не може бути використана в дослідженнях, які проводяться за принципами GLP, і повинна бути або відповідним чином оброблена, або знищена. Необхідно враховувати і перспективні забруднення або дефекти системи, що можуть виникнути згодом та вплинути на якість даних; у цьому випадку система піддається карантину до її «очищення». До моменту початку експериментальної роботи тест-система повинна бути вільною від будь-яких забруднень, дефектів або факторів, здатних вплинути на проведення дослідження. Якщо в процесі дослідження виявляється, що тест-система не відповідає цим вимогам (напр., існує забруднення або дефекти), то для забезпечення достовірності дослідження вона підлягає обробці, якщо це можливо, або знищенню, якщо це необхідно. Будь-які порушення стану тест-системи та процедури обробки, як до, так і під час дослідження, фіксуються у відповідному документі.

4) повинні вестися записи, що відображають походження тест-систем (напр., види тварин, тканин), вимоги до їх утримання, ідентичність, джерело надходження, дата початку та умови вирощування.

5) до початку експозиції досліджуваних та референтних матеріалів тест-системи підлягають акліматизації (при необхідності) в умовах проведення випробувань протягом адекватного періоду. Використання тест-систем після їх одержання повинно бути узгоджене з протоколом та/або СОП;

6) інформація, необхідна для правильної ідентифікації тест-системи *in vitro*, повинна бути зафіксована протягом всього дослідження. Індивідуальні матеріали випробувань (флакони, чашки), що готуються і використовуються при проведенні досліджень, повинні бути належним чином підписані. Якщо такі матеріали мають занадто малі розміри для маркування, їх необхідно вміщувати в більший контейнер, позначений відповідним чином;

7) будь-які матеріали, що знаходяться в контакті з тест-системою, повинні бути вільні від забруднень. Доцільно застосовувати стерильне устаткування і використовувати прийоми належних технологій культивування [26].

Принципи GLP стосовно обговорення протоколу та проведення випробування наведені в табл. 8.

Складові дослідження. Замовник складових досліджень призначає управління дослідженням, яке здійснює спостереження за установами, що проводять дослідження [27, 28]. Управління дослідженням не повинно безпосередньо відповідати за дотримання принципів GLP, оскільки це є прямим обов'язком керівника установи, яка проводить дослідження. Проте, існують деякі принципи GLP, що входять до переліку обов'язків управління дослідженням. Наприклад, протокол дослідження повинен визначати основні обов'язки членів управління дослідженням, включаючи голову та координатора дослідження. Може виявитися доцільним призначення окремої особи до управління дослідженням з координації дотримання принципів GLP, проте, інші обов'язки щодо відповідності установи, яка проводить дослідження, вимогам GLP лежать на її керівникові. Деякі з обов'язків управління дослідженням наведено на рис. 5 [29, 30]. Управління дослідженням несе відповідальність за відбір лабораторій, які беруть участь у випробуваннях, але не за призначення відповідального виконавця, що є прерогативою керівника установи.

Протокол визначає мету дослідження, терміни його виконання, перелік лабораторій, які беруть участь у дослідженні та прізвища керівника установи, яка проводить дослідження, відповідального виконавця та головного дослідника. У випадку, коли немає офіційно призначеного відповідального виконавця або головного дослідника, повинні призначатися особи, відповідальні за технічну сторону проведення роботи.

У протоколі дослідження необхідно вказати:

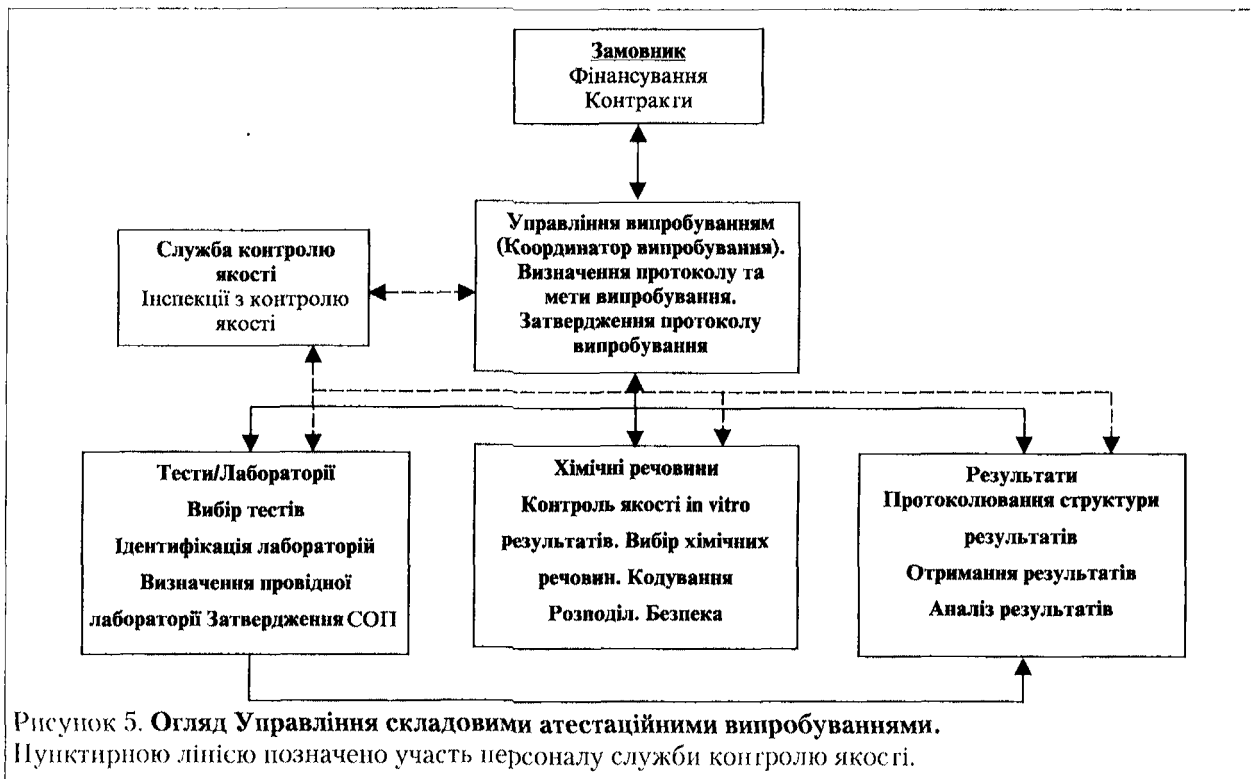
координатора дослідження;

– особу, відповідальну за СОП, якщо в дослідженні використовуються загально прийняті СОП;

– умови проведення моніторингу щодо контролю якості дослідження;

– місце збереження матеріалів дослідження (архів).

Протокол дослідження повинен підписуватись, принаймні, головою управління дослідженням та затверджуватись. Будь-які зміни в протоколі дослідження повинні подаватися у вигляді поправок, послідовно нумеруватися і направлятися для ознайомлення виконавцям.



## Належна лабораторна практика (GLP)

Прізвище та місцезнаходження координатора дослідження має визначатися в кожному окремому протоколі дослідження. Координатор відповідає за узгодження порядку надходження та аналіз матеріалів дослідження, а також підготовку звіту. Необхідно зазначити, що координатор дослідження має прямий доступ до зашифрованих матеріалів випробувань.

В обов'язки координатора дослідження входить:

- 1) відповідальність за координацію та постачання, а також аналіз матеріалів тестування та порівняння, обробку, в тому числі статистичну, даних всіх досліджень, що входять у складове дослідження;
- 2) забезпечення реєстрації міжлабораторного обміну документами та даними;
- 3) забезпечення проведення моніторингу дослідження службою гарантії якості досліджень відповідно до протоколу дослідження;
- 4) оцінка та документація будь-яких поправок та/або відхилень від протоколу або плану дослідження, що впливають на якість та цілісність складового дослідження;
- 5) забезпечення своєчасного надходження окремих звітів досліджень для статистичного аналізу даних;
- 6) підготовка звіту дослідження, що може також здійснюватись відповідальним виконавцем або незалежною особою;
- 7) забезпечення точності відображення у звіті результатів складового дослідження, підтвердженням чого є датований підпис координатора дослідження на заключному звіті;
- 8) забезпечення належної передачі документації дослідження до архіву.

Звіт за результатами випробувань включає опис мети, використаних методів, отриманих результатів та висновків складового дослідження, охоплюючи фактично декілька звітів досліджень, а також звітів щодо поставки матеріалів випробувань та статистичної обробки результатів. Порядок підготовки звіту дослідження наведено на рис. 6. Координатор, який може виступати відповідальним як за звіт, так і науковий висновок, здійснює спостереження за їх підготовкою. Підписувати звіт дослідження повинні координатор дослідження, голова управління дослідженням, працівник статистичної служби та відповідальний виконавець. Не зважаючи на те, що відповідальний виконавець може не брати участі у підготовці звіту, його підпис засвідчує, що звіт точно відображає результати досліджень. Звіт повинен містити висновок, підписаний координатором дослідження, у якому коментуються точність і повнота звіту дослідження, вказуються всі фактори, здатні вплинути на достовірність досліджень, включаючи відповідність його принципам GLP. Висновок служби контролю якості досліджень може включатися в звіт дослідження для підтвердження того, що проводився моніторинг дослідження і звіт точно відображає

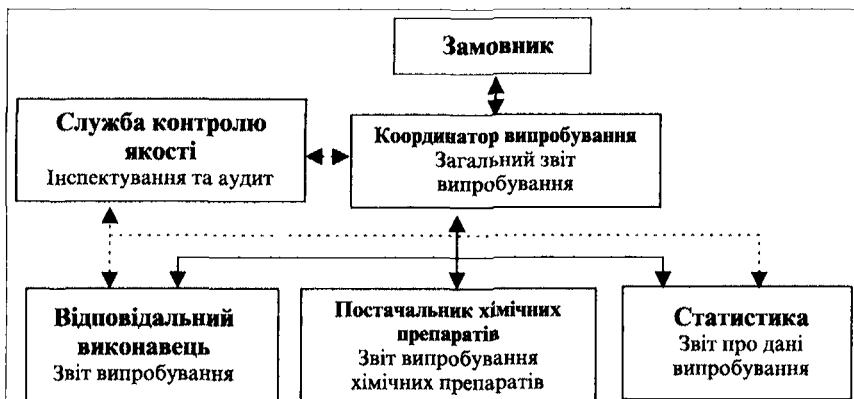


Рисунок 6. Підготування звіту випробування.

Декілька служб контролю якості можуть бути включені до складового випробування

Пунктирною лінією позначено участь персоналу служби контролю якості

дані дослідження.

До складового дослідження можуть залучатись незалежні лабораторії, які офіційно не відповідають принципам GLP, так само, як і лабораторії, що проводять аналіз матеріалів випробувань. Моніторинг служби контролю якості в таких лабораторіях носить консультативний характер по забезпеченню їхньої відповідності принципам GLP, дає можливість контролю за обміном даними досліджень між лабораторіями.

Висновок служби контролю якості повинен направлятися до основних лабораторій, а також координатору дослідження. На додаток до цього може здійснюватися підготовка періодичних зведень та звітів служби контролю якості, що направляються до управління дослідженням та замовнику. Доцільно додати висновок служби контролю якості і до звіту для одержання незалежного підтвердження того, що останній точно відображає звіти за окремими дослідженнями, отримані дані та звіти щодо аналізу хімічних препаратів.

## Література

1. Comparison of the up-and-down, conventional LD<sub>50</sub>, and fixed-dose acute toxicity procedures/Lipnick R.L., Cotruvo J.A., Hill R.N. et al.//Food and Chem. Toxicol.– 1995.– V.33.– P. 223–231.
2. Anon. Statistics of Scientific Procedures on Living Animals in Great Britain 1994.– London: HMSO, 1995.– 52 p.
3. Ekwall B. Correlation between cytotoxicity in vitro and LD<sub>50</sub> values//Acta Pharmacol. Toxicol.– 1983.– V.52 (Suppl.II).– P. 80–99.
4. Comparison of the in vitro toxicities of 59 chemicals/Clothier R.H., Hulme L.M, Smith M., Balls M.//Mol. Toxicol.– 1987. – V.1.– P.– 571–577.
5. Survey of the QSAR and in vitro approaches for developing non-animal methods to supersede the in vivo LD<sub>50</sub> test/Phillips J.C, Gibson W.B. Yam, J. et al.//Food and Chem. Toxicol.– 1990. – V.28.– P. 375–394.
6. Correlation of acute lethal potency with in vitro cytotoxicity/Fry J.R., Garle M.J., Hammond A.H., Hatfield A.//Toxicol. in Vitro.– 1990.– V.4.– P. 175–178.
7. Comparison of in vivo acute lethal potency and in vitro cytotoxicity of 48 chemicals/Shrivastava R., Delomenie C., Chevalier A. et al.//Cell Biol. Toxicol.– 1992.– V.8.– P. 157–170.
8. Garle M.J., Fentem J.H., Fry J.R. In vitro cytotoxicity tests for the prediction of acute toxicity in vivo//Toxicol. in Vitro.– 1994.– V.8.– P. 1303–1313.
9. Parish W. The future for acute oral toxicity testing//Animals and Alternatives in Toxicology – Present Status and Future Prospects/Ed. by M.Balls, J.Bridges, J.Southee.– New York: VCH Publishers, 1991.– P. 19–20.
10. Cellular methods for identification of neurotoxic chemicals and estimation of neurotoxicological risk/Walum E.; Nordin M., Beckman M., Odiand L.//Toxicol. in Vitro.– 1993.– V.7.– P. 321–326.
11. The practical applicability of hepatocyte cultures in routine testing/Blaauboer B.J., Boobis A.R., Castell J.V. et al.//The report and recommendations of ECVAM workshop 1.– ALTA, 1994.– 22.– P. 231–241.
12. Ericsson A.C., Walum E. Differential effects of allyl alcohol on hepatocytes and fibroblasts demonstrated in roller chamber co-cultures//ATLA.– 1988.– 15.– P. 208–213.
13. Voss J.-U., Seibert H. Microcarrier-attached rat hepatocytes as a xenobiotic-metabolising system in co-cultures//Cell Biol. Toxicol.– 1991.– V.7.– P. 387–399.
14. Voss J.-U., Seibert H. Toxicity of glycols and allyl alcohol evaluated by means of co-cultures of microcarrier-attached rat hepatocytes and Balb/c 3T3 mouse fibroblasts//ATLA, 1992.– 20.– P. 266–270.
15. The integrated use of alternative approaches for predicting toxic hazard/Barratt M.D., Castell J.V., Chamberlain M et al.//The report and recommendations of ECVAM workshop 8. – ALTA, 1995.– 23.– P. 410–429.
16. Cytotoxicity evaluation of the first ten MEIC chemicals: acute lethal toxicity in man predicted by cytotoxicity in five cellular assays and by oral LD<sub>50</sub> tests in rodents/Ekwall B., Bondesson I., Castell J.V. et al.//ATLA.– 1989.– 7.– P. 83–100.

17. Gulden M., Seibert H., Voss J.-U. Inclusion of physicochemical data in quantitative comparisons of *in vitro* and *in vivo* toxic potencies//ATLA.– 1994.– 22.– P. 185–192.
18. Ericsson A.C., Walum E. Cytotoxicity of cyclophosphamide and acrylamide in glioma and neuroblastoma cell lines co-cultured with liver cells//Toxicol. Lett.– 1984.– V.20.– P. 251–256.
19. Walum E., Varnbo I., Peterson A. A multiple cell-culture toxicity test system based on neuroblastoma C1300 cells and differentiated primary cultures of brain, muscle, heart, and liver cells//Food and Chem. Toxicol.– 1986.– V.24.– P. 567–568.
20. Gulden M. *In vitro* toxicity screening using cultured rat skeletal muscle cells. I. Surfactants and mitochondrial poisons//Toxicol. in vitro.– 1993.– V.7.– P. 25–34.
21. Gulden M., Seibert H., Voss, J.-U. *In vitro* toxicity screening using cultured rat skeletal muscle cells. II. Agents affecting excitable membranes//Toxicol. in vitro.– 1994.– V.8.– P. 197–206.
22. Organisation for Economic Cooperation and Development (OECD) series on Principles of Good Laboratory Practice and compliance monitoring, Number 1. OECD Principles on Good Laboratory Practice (as reused in 1997). OECD Environmental Health and Safety Publications, Environment Directorate: ENV/MC/CHEM(98) 17. - Paris: OECD, 1998.
23. Adapting to technical progress the Principles of Good Laboratory Practice as specified in Council Directive 87/18/EEC on the harmonisation of laws, regulations and administrative provisions relating to the application of the principles of good laboratory practice and the verification of their applications for tests on chemical substances. Commission Directive 1999/11/EC. //Official Journal of the European Communities.– 1999.– V. 77.– P. 8–21.
24. Environment Monograph No 50. Series on Principles of Good Laboratory Practice and Compliance Monitoring: Number 6//The Application of the GLP Principles to Field Studies. Paris: OECD, 1992.
25. Stiles T. The revised OECD principles of Good Laboratory Practice: a reflection upon the impact of the proposed changes on pre-clinical safety testing. Part 1. Scope, definition of terms, responsibilities//Quality Assurance J.– 1997.– V.2.– P. 13–18.
26. Froud S.J., Luker J. Good Laboratory Practice in the cell culture laboratory//Basic Cell Culture: A Practical Approach/Ed. by J.M.Davis.– Oxford: Oxford University Press, 1994.– P. 273–286.
27. Stiles T. The revised OECD Principles of Good Laboratory Practice: a reflection upon the impact of the proposed changes on pre-clinical safety testing. Part 2. Scope, definition of terms, responsibilities//Quality Assurance J.– 1997.– V.2.– P. 49–53.
28. Cooper-Hannan R. Good Laboratory Practice and study management for the validation of *in vitro* toxicity studies//ATLA.– 1997.– V.12.– P. 527–537.
29. Practical aspects of the validation of toxicity test procedures/Balls M., Blauboer B.J., Fentem J.H. et al.//ATLA.– 1995.– V.23.– P. 129–147.
30. The ECVAM international validation study on *in vitro* tests for skin corrosivity. 2. Results and evaluation by the Management Team/Fentem J.H., Archer G.E.B., Balls M. et al.//Toxicol. in vitro.– 1998.– V.12.– P. 483–524.



**Розділ II**

**ДОКЛІНІЧНЕ ВИВЧЕННЯ  
НЕСКІДЛИВОСТІ ЛІКАРСЬКИХ  
ЗАСОБІВ**

## ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНЕ ВИВЧЕННЯ ТОКСИЧНОЇ ДІЇ ПОТЕНЦІЙНИХ ЛІКАРСЬКИХ ЗАСОБІВ

Коваленко В.М.,  
Стефанов О.В.,  
Максимов Ю.М.,  
Трахтенберг І.М.

### Вступ

Процес створення фармакологічних засобів потребує розробки нових підходів, удосконалення шляхів та порядку створення ефективних медичних препаратів з урахуванням нових досягнень в галузі науки та техніки. Зараз значно зросли вимоги щодо організаційних принципів на всіх етапах розробки, дослідження, запровадження та виробництва фармакологічних засобів. Це обумовлене необхідністю гарантувати високу якість виконання окремих стадій розробки ліків, зокрема, надійності результатів доклінічного вивчення їх безпечності. Більшість небажаних проявів побічної дії лікарських препаратів можна передбачити та попередити, виходячи з даних, одержаних в експериментах з використанням тест-систем. Досліди на тваринах дозволяють значною мірою гарантувати безпечність клінічних випробувань та наступного медичного застосування нових лікарських засобів. Сучасні програми доклінічного вивчення безпечності нових фармакологічних засобів в більшості розвинених країн суттєво не відрізняються одна від одної і суворо регламентуються відповідними органами охорони здоров'я.

До глобальних світових досягнень науково-технічного прогресу належить система Надійної Лабораторної Практики (Good Laboratory Practice – GLP). Міжнародне поширення GLP, яка запроваджує уніфікацію умов, що охоплюють практично всі етапи експерименту, та сприяє суттєвому зростанню рівня організації досліджень, метою яких є обґрунтування безпечності біомедичних розробок, що пропонуються до широкого використання, безумовно, є значною подією в історії доклінічної практики створення лікарських засобів. Обсяг досліджень загальної токсичності обумовлюється належністю препарату до відповідної групи лікарських засобів, рубрикація яких представлена в Інструкції про порядок проведення спеціалізованої оцінки та експертизи матеріалів на лікарські засоби у Державному науково-експертному центрі лікарських засобів МОЗ України (наказ МОЗ України № 246 від 08.10.99). У зв'язку з відсутністю в Україні систематизованих даних літератури з доклінічного вивчення загальнотоксичної дії потенційних фармакологічних речовин і були розроблені ці методичні рекомендації з висвітленням основних положень GLP.

### 1. Основні терміни та поняття

**Випробування** – експеримент або серія експериментів з вивчення досліджуваної речовини з метою одержання даних про її властивості та/або безпечність для здоров'я людини.

**Гостра токсичність** визначається як короткотривала шкідлива дія на організм досліджуваної речовини в умовах одноразового або багаторазового протягом 24 год її введення.

**Доза** – кількість речовини, яка діє на організм. Доза виражається як маса (об'єм) досліджуваної речовини (г, мг, мл тощо) або маса (об'єм) досліджуваної речовини на одиницю маси тварини (напр., мг/кг, мл/кг).

**Доза максимально переносима (DL<sub>0</sub>)** – найбільша кількість отрути, введення якої в організм не викликає загибелі піддослідних тварин.

**Доза середня ефективна ( $DE_{50}$ )** – кількість речовини, яка викликає певний ефект у 50 % стандартної групи піддослідних тварин протягом певного терміну спостереження.

**Доза середня смертельна ( $DL_{50}$ )** – статистично розрахована доза речовини, введення якої викликає загибель 50 % стандартної групи піддослідних тварин протягом певного терміну спостереження. Величина  $DL_{50}$  виражається відношенням маси (об'єму) досліджуваної речовини до одиниці маси тіла тварини (мі/кг, мл/кг та ін.).

**Дозування** – термін, який враховує дозу, частоту та тривалість введення речовини.

**Зразок** – певна кількість досліджуваної або контрольної речовини.

**Інтегральні показники інтоксикації** – показники, які характеризують зміни загального стану організму (напр., маса тіла, температура тіла).

**Інтерпретація (даних)** – оцінка всіх фактів, отриманих в результаті даного дослідження.

**Інтоксикація** – патологічний стан, викликаний дією на організм токсичних речовин екзогенного та ендogenousного походження.

**Керівник випробувань** – особа, яка несе особисту відповідальність за проведення досліджень в цілому.

**Міжвидові відмінності (видова чутливість)** – кількісні та якісні особливості реагування на дію речовини в залежності від виду тварини.

**Міжвікові відмінності (вікова чутливість)** – кількісні та якісні особливості реагування на дію речовини в залежності від віку.

**Надійна Лабораторна Практика (GLP)** – організація процесу та умов, за яких лабораторні випробування плануються, виконуються, контролюються, ресструються, представляються у вигляді звіту та зберігаються в архіві.

**Носій (розчинник)** – агент, який використовується для змішування, диспергування або розчинення досліджуваної та контрольної речовини.

**Віддалена дія** – ефект, який проявляється у віддалений період після закінчення введення отрути.

**Первинні дані** – всі вихідні робочі записи, примітки, зареєстровані і задокументовані дані лабораторних випробувань та результати візуальних спостережень, а також затверджені їх копії.

**Проба** – матеріальне похідне тест-системи, призначене для дослідження, аналізу або зберігання.

**Протокол** – документ, який визначає загальний обсяг випробувань.

**Речовина для порівняння (контрольна речовина)** – добре відома хімічна речовина або суміш, що використовується для порівняння з речовиною, що випробовується.

**Речовина, що досліджується** – хімічна (біологічна) речовина або суміш, яка підлягає дослідженню.

**Середній час загибелі тварин** – середній час, протягом якого гине 50 % тварин після гострого отруєння.

**Серія** – обмежена кількість або партія речовини, що випробовується, або контрольної речовини, одержаної протягом певного циклу виробництва способом, який передбачає наявність постійної характеристики і відповідної позначки.

**Стандартні операційні процедури (СОП)** – документ, в якому детально викладено, як виконувати певні лабораторні процедури.

**Терапевтичний індекс** – відношення середньої смертельної дози до середньої ефективної дози речовини ( $DL_{50}/DE_{50}$ ).

**Тест-система** – будь-яка тварина, рослина, мікроорганізм, а також клітинна, субклітинна, хімічна та фізична система або їх комбінація, що використовується у випробуваннях.

**Токсикологія** – наука про потенційну небезпечність дії речовин (отрут) на живі організми та екосистеми, про механізми дії, діагностику, профілактику та лікування інтоксикацій.

**Токсикометрія** – сукупність методів та прийомів дослідження з метою кількісної оцінки токсичності та небезпечності речовин.

**Токсичність** – міра несумісності речовини з життям, величина протилежна абсолютному значенню середньосмертельної дози ( $1/DL_{50}$ ) або концентрації ( $1/CL_{50}$ ).

**Установа-виконавець** – установа, яка має відповідний персонал, приміщення та умови, необхідні для проведення досліджень.

**Фармакологічна речовина** – хімічна сполука (сума речовин), одержана в результаті хімічного синтезу чи добута з природних об'єктів, а також нове сполучення відомих речовин, що мають певну фармакологічну дію.

**Експериментальні тварини** – це тварини, які використовуються або будуть використані в експерименті.

**Екстраполяція** – математичний розрахунок, заснований на наявних даних та призначений для оцінки вірогідного зв'язку між дозою речовини та ефектом або відповідною реакцією. Вона включає кількісне передбачення можливих біологічних реакцій організму людини, викликаних дією речовини або дії на організм тварин цієї ж речовини.

**Ефект** – біологічні зміни внаслідок дії речовини.

## **2. Організація та проведення випробувань**

### **2.1. Планування досліджень**

Невід'ємним елементом всіх доклінічних досліджень нешкідливості є ґрунтовний протокол – документ, який визначає повний обсяг випробувань і в комплексі із стандартними операційними процедурами має забезпечити максимальну їх деталізацію. Його призначенням є визначення мети досліджень та завдань для її досягнення.

Керівник випробувань несе основну відповідальність за ґрунтовність розробленого протоколу і своїм підписом гарантує повне дотримання його при виконанні випробувань.

Керівник установи-виконавця, керівник випробувань та замовник підписують і датують протокол, що є свідченням його формального затвердження. З метою гарантії чіткого визначення об'єкта досліджень, наявності відповідного персоналу та матеріальних умов для проведення досліджень протокол затверджується до початку випробувань.

Важливим елементом протоколу є детальне викладення плану експерименту, включаючи методи контролю за проявами непередбачених факторів впливу на проведення досліджень. В ньому вказуються дози, кількість тварин в кожній групі, їх номери, а також методи рандомізації при розподілі на піддослідні групи, відбір тварин на різні види випробувань або проміжну евтаназію.

Добре підготовлений та затверджений протокол виключає необхідність внесення змін та поправок в ході проведення випробувань. Але в разі необхідності, наприклад, за наявності неочікуваних токсичних ефектів, які зумовлюють доцільність додаткових досліджень, такі доповнення слід включати до протоколу. Це є обов'язком керівника випробувань, який до відповідного документа, що додається до протоколу, вносить всі зміни та доповнення з їх обґрунтуванням, ставить підпис та дату.

### **2.2. Фармакологічна речовина**

На початкових етапах доклінічних досліджень (первинний токсико-фармакологічний скринінг) предметом вивчення є потенційна фармакологічна речовина (сума речовин, нове сполучення), яка не має визначеної лікарської форми.

Токсикологічні дослідження нової фармакологічної речовини, відібраної в результаті первинної токсико-фармакологічної оцінки біологічної дії, проводяться за схемою програмованого скринінгу з реєстрацією критеріїв гострої, підгострої та хронічної токсичності та використанням набору тестів, які дають змогу оцінити тип дії речовини.

Експериментальні дослідження нової фармакологічної речовини проводяться у порівнянні з контрольною речовиною. Ефективність та безпека є критерієм доцільності подальшого

вивчення оригінальних речовин. Доклінічне токсикологічне вивчення нових лікарських форм повинно включати як контроль вихідну лікарську форму.

Перед початком випробувань потенційного лікарського засобу необхідно для кожної партії мати відомості щодо його походження, хімічного складу, основних характеристик:

- ◇ чистота;
- ◇ стабільність індивідуальної речовини та в суміші з носієм;
- ◇ склад;
- ◇ структура;
- ◇ фізико-хімічні властивості (агрегатний стан, розчинність, точка плавлення/кипіння, рН);
- ◇ методи визначення.

Ємкості для досліджуваної та контрольної речовин повинні обов'язково забезпечуватися етикетками, зробленими відповідно до СОП. На них вказується назва речовини або номер коду, номер партії, термін придатності та ін. Токсикологічні дослідження обов'язкові як для субстанції, так і лікарської форми. Умови зберігання повинні забезпечувати збереження складу, концентрації, чистоти та стабільності як досліджуваної, так і контрольної речовин. На процедуру визначення їх ідентичності, чистоти, складу та стабільності, а також наявності контамінантів слід розробити відповідні СОП. При необхідності використання носія (розчинника) при проведенні випробувань розробляються СОП щодо визначення його гомогенності та стабільності. На етикетці, яка супроводжує ємкість з носієм (розчинником) досліджуваної та контрольної речовин, вказується стабільність їх складу та гомогенність. Результати вказаних досліджень реєструються в спеціальному журналі.

Дані про стабільність дають змогу почати випробування, але в окремих випадках є недостатніми. Якщо тривалість випробувань перевищує чотири тижні, необхідно періодично (раз на місяць) відбирати зразки досліджуваної та контрольної речовин на аналіз та зберігати їх протягом двох років після дозволу препарату до медичного застосування та промислового виробництва.

При необхідності змішування, розведення, приготування суспензії або розчину досліджуваної та контрольної речовин повинна бути вказана концентрація та ступінь гомогенності суміші. Крім того, до початку випробувань має проводитись вивчення стабільності досліджуваної та контрольної речовин в суміші з носієм та/або допоміжними компонентами з метою відпрацювання режиму їх приготування та введення до тест-системи. Для попередження помилок при проведенні досліджень та запобігання забрудненню при приготуванні сумішей речовин повинні використовуватись СОП. Рекомендується призначати відповідального за зберігання, видачу речовин для випробувань. У відповідному журналі реєстрації зазначається кому, коли і з якою метою видано речовини та ставляться підписи відповідального за речовини та співробітника, який їх отримав.

Приміщення, в яких проводяться випробування, повинні бути облаштовані таким чином, щоб забезпечити порядок одержання, зберігання та змішування досліджуваної та контрольної речовин з тим або іншим носієм (розчинником). Це сприяє запобігання взаємозабруднення та помилок при ідентифікації. Місця зберігання досліджуваної та контрольної речовин повинні бути відокремлені одне від одного, а також від лабораторних приміщень, де проводяться випробування.

Клас за типом фармакологічної дії речовини відображається на етикетці, яка регламентується відповідною СОП.

Дія небезпечних речовин може викликати гострі та хронічні отруєння, опіки, розлади дихання. Для попередження ризику при роботі з такими речовинами необхідно дотримуватись існуючих правил техніки безпеки, наприклад:

- ◇ речовини необхідно зберігати герметично закоркованими;
- ◇ при можливості замість небезпечних використовувати речовини-замінники;
- ◇ відображати на етикетці попереджувальні символи (ідкі, подразнювальні, вогне-, вибухо-небезпечні та ін.).

З метою попередження випадків попадання в очі рідин при проведенні маніпуляцій з речовинами, на етикетках яких вказано вищезазвані символи небезпеки, необхідно одягати захисні окуляри.

✓ **2.3. Тест-системи**

Можливість відтворення і повторення медико-біологічного експерименту, порівняльна характеристика та інтерпретація одержаних результатів залежать від ступеня стандартизації тест-систем.

Наступним кроком після визначення мети дослідження є обґрунтований вибір відповідної тест-системи, що визначається протоколом випробувань. Бажають мати історичну довідку щодо тест-систем, які використовуються в кожному конкретному дослідженні.

**Фізико-хімічні тест-системи** – це апаратура, яка використовується для одержання фізико-хімічних даних. Вона повинна знаходитись у належному місці, мати відповідну інструкцію з експлуатації і відповідати вимогам якості. Важливою вимогою щодо фізико-хімічних тест-систем є регулярне їх калібрування. Дії щодо калібрування та вимірів мають узгоджуватись з міжнародними та національними стандартами або забезпечуватись адекватним способом відтворення кореляції та уточнення результатів випробувань. Для гарантії достовірності даних фізико-хімічних тест-систем повинні використовуватись контрольні (референтні) речовини. Для всіх типів приладів повинен бути встановлений спеціальний розклад калібрування протягом усього часу їх використання. рН-метри слід калібрувати щоденно. Надійність шкали довжини хвилі спектрофотометрів в ультрафіолетовій частині спектра треба перевіряти раз на тиждень, а повне калібрування слід проводити раз на місяць. Інфрачервоний спектрофотометр вимагає калібрування щокварталу, рефрактометри та спектрофлуориметри повинні перевірятись раз на півроку. Аналітичні терези слід контролювати (перевіряти) не менше одного разу у півріччя. До кожного приладу додається СОП з його експлуатації, перевірки та калібрування з розкладом відповідних дат. Бажають проводити регулярні перевірки фізико-хімічних тест-систем фахівцями фірми-виробника.

В ідеальному випадку оцінка безпечності речовин має проводитись з використанням **біологічних тест-систем**, зокрема тварин, у яких метаболізм та чутливість органів та систем, а отже, і токсичний ефект препарату подібні до людського. На жаль, підібрати таку модель майже неможливо. Реальнішим є проведення вивчення токсичності на різних видах тварин за умови відтворюваності моделі і більшості патологічних порушень, що виникають. Крім того, вибір тест-системи визначається доступністю, зручністю в догляді, економічністю, наявністю бази даних по тест-системі. Експерименти на тваринах дають можливість визначитись щодо доцільності проведення клінічних випробувань потенційних лікарських засобів.

В установі, яка проводить дослідження нешкідливості, повинні бути створені умови, здатні забезпечити стандартизацію прийому, оцінку якості та утримання біологічних тест-систем. При цьому слід забезпечити контроль за факторами довкілля і створити оптимальні умови утримання, що має сприяти зведенню до мінімуму потенційного впливу неконтрольованих факторів (фізичних, хімічних, мікробіологічних) на результати досліджень.

Установа, яка проводить випробування, повинна мати необхідну кількість кімнат для тварин, а також приміщень, які б гарантували дотримання таких умов:

- ◇ розподіл за видами або тест-системами;
- ◇ територіальний розподіл окремих випробувань, які виконуються одночасно;
- ◇ забезпечення карантину тварин;
- ◇ звичайне або спеціальне утримання тварин.

Дослідження, які виконуються на тест-системах з використанням біологічно небезпечних, летких, радіоактивних, аерозольних речовин і інфекційних агентів, повинні бути відокремлені.

Необхідно забезпечити наявність приміщень для діагностики, лікування і контролю за станом лабораторних тварин. Вони повинні бути повністю ізольовані від кімнат, в яких утримуються здорові тварини.

В цілому, приміщення для утримання тварин повинні бути спроектовані і сконструйовані так, щоб звести до мінімуму несприятливий вплив на хід виконання досліджень та їх результати.

Наступною вимогою є необхідність ізоляції новоодержаних тварин із зовнішнього джерела з метою оцінки їх здоров'я відповідно до ветеринарної практики. При цьому встановлюються параметри моніторингу для кожного виду, частота реєстрації і тривалість періоду доекспериментальної оцінки. Тварини повинні бути ізольовані на термін, необхідний для забезпечення гарантії клінічних проявів більшості загальних захворювань, характерних для відповідних видів тварин. Тривалість карантину залежить від виду тварини і повинна базуватись на відповідній ветеринарно-медичній практиці, але має становити не менше одного тижня. Необхідно, щоб умови утримання під час карантину та доклінічні спостереження були, в основному, такими ж, як при проведенні випробувань.

Звичайно догляд за тваринами регламентується протоколом і СОП. Вони повинні включати візуальну оцінку зовнішнього стану, спостереження за поведінкою, токсичними проявами, споживанням води та їжі, щоденну реєстрацію загибелі, зважування, пальпацію, офтальмоскопію та ін. Частота таких оглядів уточнюється протоколом. СОП повинні передбачати спосіб і місце реєстрації спостережень, сприяти їх стандартизації з використанням загальноприйнятої термінології і методів. Спостереження повинні продовжуватися від часу появи тієї чи іншої зміни до її зникнення або обстежень після евтаназії.

Загибель тварин – вирішальний показник токсикологічного експерименту. Ці дані необхідно палежним чином збирати, накопичувати, зберігати і оцінювати. Повинні існувати СОП, що стосуються непередбаченого забою, з урахуванням процедури евтаназії та її обґрунтування, визначенням відповідальної особи і способу вилучення загиблої тварини. Непередбачене зменшення кількості тварин в досліді повинно бути задокументоване із залученням відповідних СОП, які охоплюють, як мінімум, ідентифікацію тварин, дату і час загибелі, причини і обґрунтування забою (специфічні спостереження за станом тварини, що гине). Для кожної експериментальної тварини має бути чітко визначено, чи вона забита (і це повинно бути задокументовано), чи загинула в ході експерименту. Порядок поводження з тваринами, що загинули або з тими, що гинуть, підготовка кімнат для їх посмертного обстеження, умови транспортування, розміщення та ідентифікації визначаються відповідними СОП.

### 2.3.1. Види тварин та стать

Кількість досліджуваних доз та тварин визначається програмою протоколу, вимогами статистики, тривалістю експерименту.

Виходячи із зручності у поводженні, економічних факторів та наявності достатньої бази даних, найчастіше використовуються миші, щури, кролі, морські свинки та собаки. Серед гризунів перевага надається щурам. В табл. 1 наведені вік та маса тіла дорослих тварин, які найчастіше використовуються в токсикологічних дослідженнях.

Якщо фармакологічний засіб пропонується для використання в педіатричній або геріатричній практиці, доклінічні дослідження токсичних властивостей проводяться відповідно на статевозрілих або старих тваринах. Тривалість життя деяких видів експериментальних тварин наведено в табл. 2.

Враховуючи варіабільність біологічних тест-систем, завжди необхідно дотримуватись балансу між кількістю тварин, теоретично необхідною для визначення всіх щонайслабших ефектів, та кількістю, достатньою для визначення суттєвих токсичних ефектів. При випробуванні нових речовин з невідомими біологічними властивостями часто вини-

Таблиця 1

#### Маса тіла дорослих тварин, які використовуються в токсикологічних дослідженнях

Вид тварин	Вік, міс	Маса тіла, г
Миші	2,0–2,5	18–22
Білі щури	2,5–3,0	150–240
Морські свинки	3,0–4,0	450–500
Кролі	4	2000–3000
Собаки	9	залежно від породи

Тривалість життя та вікові періоди деяких видів експериментальних тварин [3]

Вид тварин	Початок статевої зрілості	Закінчення репродуктивного віку	Середня тривалість життя, роки
Миші	7 тижнів	8 місяців	2,5
Щури	13 тижнів	1,5 року	3
Морські свинки	12 тижнів	2-4 роки	6
Кролі	6-9 місяців	3 роки	6
Коти	10-15 місяців	5-8 років	12-16
Собаки	10-14 місяців	6-14 років	12-14

кають непередбачені прояви токсичної дії, що потребує для отримання адекватної інформації щодо виявлених ефектів додаткових досліджень, а отже, збільшення кількості тварин.

У досліджах використовуються молоді статевозрілі тварини обох статей, у яких коливання маси тіла не перевищують  $\pm 5-7\%$ . Самки мають бути віргільні та невагітні.

### 2.3.2. Умови утримання тварин

Дослідження повинні проводитись в умовах контролю за факторами довкілля. Необхідно підтримувати температуру та відносну вологість повітря в межах даних табл. 3. Цикл чергування світла та темряви – протягом 12 год кожний.

Таблиця 3

Температура та відносна вологість повітря в приміщеннях для утримання експериментальних тварин [4]

Вид тварин	Температура, °C	Відносна вологість, %
Щури	20-25	50-55
Миші	22-25	50-70
Морські свинки	16-20	50-60
Кролі	16-20	40-50
Хом'яки	21-24	45-65
Собаки	18-21	45-55
Коти	20-22	45-60

Рацион та якість води мають бути стандартними, відповідати всім вимогам харчування для даного виду тварин і постійно контролюватись. Необхідно враховувати вплив режиму харчування на метаболізм та тривалість життя, а також розвиток клінічних проявів токсичності. Доступ до води – необмежений.

Тварини повинні утримуватись групами за статтю або індивідуально в залежності від виду та розміру, а також з урахуванням вимог окремих досліджень. Гризуни можуть розміщуватись в клітках групами, зазвичай не більше трьох в клітці, забезпечуючи можливість огляду кожної тварини. Біологічні властивості досліджуваної речовини та її токсичні ефекти (наприклад, загибель, зростання збудливості та ін.) є свідченням необхідності індивідуального розміщення. Великі тварини, наприклад, кролі та собаки, звичайно, утримуються індивідуально.

### 2.4. Розчинники та носії

При необхідності досліджувана речовина розчиняється або суспендується з використанням відповідного розчинника, переважно води, фізіологічного розчину або 0,5 % водного розчину метилцелюлози. Якщо розчинення або суспендування до гомогенної форми у водному середовищі неможливе, використовується рослинна олія, водний розчин етанолу, пропіленгліколь та інші розчинники. Для приготування суспензій можуть використовуватись магнітні мішалки, мікромлини та гомогенізатори. Іноді для одержання гомогенних суспензій використовуються такі поверхнево активні речовини, як Tween 80, Span 20, Span 60. Але у таких випадках необхідно усвідомлювати, що поверхнево активні речовини здатні потенціювати процеси абсорбції досліджуваної речовини. У зв'язку з можливим впливом розчинника на токсичність необхідно включати групу тест-системи для контролю розчинника. Тварини цієї групи повин-



ні отримувати об'єм розчинника, аналогічний тому, що вводиться дослідним тваринам з найвищою дозою досліджуваної речовини.

### 2.5. Шлях введення

При дослідженні фармакологічних речовин обов'язковим є шлях введення, який передбачається для клінічного використання, та такий, що забезпечує системну дію досліджуваної речовини (напр., внутрішньовенний). У табл. 4 наведено рекомендовані об'єми рідини в залежності від шляху введення експериментальним тваринам різних видів потенційних лікарських засобів.

Таблиця 4

*Об'єми рідин/розмір голки, рекомендовані для парентеральних введень [5]*

Вид тварин	Шляхи парентерального введення			
	внутрішньовенний (вена)	внутрішньо-очеревинний	внутрішньом'язовий (м'яз)	підшкірний
Миші	Латеральна хвостова, 0,2 мл/<25	2-3 мл/<21	Чотириглавий задній стегна, 0,05 мл/<23	Задня частина шиї, 2-3 мл/<20
Щури	Латеральна хвостова, 0,5 мл/<23	5-10 мл/<21	Чотириглавий задній стегна, 0,3 мл/<21	Задня частина шиї, спина, 5-10 мл/<20
Морські свинки	Вушна, підшкірна ноги, 0,5 мл/<23	10-15 мл/<21	Чотириглавий задній стегна, 0,3 мл/<21	Задня частина шиї, спина, 5-10 мл/<20
Кролі	Крайова вушна вена, 1-5 мл/<21	50-100 мл/<20	Чотириглавий задній стегна, 0,5-1,0 мл/<20	Задня частина шиї, спина, 30-50 мл/<20
Коти	Підшкірна ноги, 2-5 мл/<21	50-100 мл/<20	Чотириглавий задній стегна, 1 мл/<20	Задня частина шиї, спина, 50-100 мл/<20
Собаки	Підшкірна стегна, 10-15 мл/<20 (повільно)	200-500 мл/<20	Чотириглавий задній стегна, 2-5 мл/<20	Задня частина шиї, спина, 100-200 мл/<20

При дослідженні гострої токсичності готової лікарської форми, яка містить низьку концентрацію діючої речовини, часто виникає необхідність введення тваринам максимально припустимих об'ємів розчинів (суспензій, емульсій) досліджуваної речовини (табл. 5).

Пероральне та внутрішньоплункове введення. Досліджувана речовина або її розчин (емульсія, суспензія) з використанням відповідного розчинника дозовано вводиться в стравохід за допомогою градуйованого зонда (для кожної групи використовується одна доза). Максимальний об'єм рідини, який може бути введений одноразово, залежить від виду експериментальної тварини. У гризунів він не повинен перевищувати 10 мл/кг маси тіла за винятком води, яку можна вводити з розрахунку 20 мл/кг. Варіації з об'ємом досліджуваної речовини мають бути мінімальні. Забезпечення постійного об'єму при різних рівнях доз досягається регуля-

Таблиця 5

*Максимально допустимі об'єми (мл) рідин для різних шляхів введення тваринам [6, 7]*

Вид тварин	Маса тіла, г	Внутрішньошкірно	Підшкірно	Внутрішньом'язово	Внутрішньовенно	Внутрішньо-очеревинно	Внутрішньо-плунково	Внутрішньо-назально	Ректально
Миші	25-30	0,05	1,0	0,5	0,2-0,5	1,0	0,8	0,1	0,5
Щури	200-240	0,02-0,04	10,0	5,0	2,0	5,0	4,0-5,0	0,4	1,0
Морські свинки	250-300	-	15,0	5,0	5,0	5,0	4,0-5,0	0,2-0,4	4,0
Кролі	2500-3000	-	30,0	15,0	20,0	20,0-30,0	150,0	1,0-4,0	5,0-10,0
Коти	2000-3000	-	10,0	5,0	5,0	5,0-15,0	-	1,0-4,0	3,0-8,0
Собаки (залежно від маси тіла)		-	5,0-20,0	10,0-15,0	10,0-20,0	20,0	-	1,0-4,0	-

цією концентрації. Іноді при вивченні хронічної токсичності в експерименті на щурах та собаках примусовий спосіб введення досліджуваних речовин в пелунок можна замінити введенням з раціоном або водою. За таких умов введення важливо дотриматись наступних умов:

1. Суміш речовини з їжею повинна бути однорідною. Наявність крупинок може привести до відхилень результатів випробувань.

2. Їжа не повинна впливати на стабільність досліджуваної речовини протягом періоду введення. Необхідно проводити попередні випробування з метою оцінки стійкості препарату в середовищі їжі.

3. Протягом випробувань через визначені умовами експерименту інтервали визначаються рівні досліджуваної речовини, яка екстрагується з лабораторного раціону з використанням відповідних аналітичних методів. Вибір адекватних аналітичних процедур є однією з основних вимог встановлення однорідності та стабільності речовини в суміші з їжею.

4. Зменшення маси тіла, кількості та споживання їжі в дослідній групі тварин у порівнянні з контрольною є свідченням непридатності даного шляху введення досліджуваної речовини.

Для розчинних та стабільних речовин для перорального введення тваринам можна використовувати питну воду. Вимоги щодо даного способу введення досліджуваних препаратів такі самі, як і для їжі.

**Інтраназальне введення.** При інтраназальному введенні використовується тонкий катетер, діаметр якого залежить від розмірів тварини. Для дрібних тварин можна використовувати мікропіпетки або ін'єкційні голки із сточеним кінцем. Оскільки ця процедура неприємна для тварини, рекомендується проводити її під легким наркозом.

**Ректальне введення.** Перед введенням препаратів в пряму кишку собакам, кішкам, кролям, морським свинкам ставлять очисну клізму. Розчини вводять за допомогою катетера. Для ректального введення препаратів дрібним тваринам використовують зонд або мікропіпетку, тварина при цьому утримується вниз головою. Розчин, що вводиться, попередньо підігрівається.

**Внутрішньовенне введення.** Незалежно від рекомендованого в клініці застосування фармакологічного засобу, хоча б на одному виді тварин доцільно провести дослідження гострої токсичності при внутрішньовенному введенні. У разі використання лікарського засобу у вигляді мазі або гелю, який не проникає через шкіру та слизові оболонки, дослідження токсичності при внутрішньовенному введенні не проводяться. При вивченні інших засобів для зовнішнього застосування такі випробування є необхідними. Внутрішньовенні ін'єкції котам, морським свинкам та хом'якам вимагають відпрепаровки судин, тому проводяться під загальним наркозом. Порівняння параметрів токсичності при внутрішньовенному та інших шляхах введення, наприклад, нашкірному або пероральному, дає змогу встановити ступінь резорбції речовин через шкіру та травний шлях. У табл. 6 вказані вени для ін'єкцій деяким видам експериментальних тварин.

Внутрішньовенний шлях введення на дрібних гризунах може бути замінений на внутрішньоочеревинний.

**Нашкірна аплікація.** За 24 години до нанесення на шкіру досліджуваної речовини шерсть на боковій поверхні тіла експериментальної тварини видаляється стрижкою або голінням. Цю процедуру слід виконувати

обережно, щоб не пошкодити шкіру, що може збільшити її проникність для досліджуваної речовини. Площа для аплікації повинна складати не менше 10 % загальної поверхні тіла, яка розраховується виходячи з маси тіла тварини (табл. 7). Для нанесення досліджуваної речовини може

Таблиця 6  
**Вени, що найчастіше використовуються для внутрішньовенних введень досліджуваних речовин експериментальним тваринам**

Вид тварин	Назва вени
Миші	Хвостова
Щури	Хвостова, підшкірна ноги
Морські свинки	Передня порожнинна, підшкірна ноги
Кролі	Яремна, крайова вушна, головна (краніальна), підшкірна ноги
Коти	Яремна, підшкірна ноги, вена стегна
Собаки	Яремна, головна (краніальна), вена стегна

*Співвідношення між площею поверхні та масою тіла людини та експериментальних тварин*

Вид	Маса тіла, кг	Поверхня тіла, см <sup>2</sup>	Відношення поверхні до маси	Коефіцієнт співвідношення
Людина	70	18 000	257	1
Кролі	1,5	1 200	826	3,2
Морські свинки	0,4	480	1 200	4,7
Щури	0,2	304	1 520	5,9
Миші	0,02	61	3 050	11,8

використовуватись) нульве-  
ризатор. Розчинник повинен забезпечувати достатній контакт зі шкірою. Якщо досліджувана речовина є рідиною, вона, як правило, використовується без попереднього розчинення.

Підшкірне та внутрішньом'язове введення. Зазначені шляхи введення є най-

менш травматичними для тварин і здійснюються відносно просто – шляхом введення визначених в табл. 3 об'ємів. При необхідності дотримання стерильності шерсть в місці введення видаляється голінням і шкіра дезінфікується. У собак та котів підшкірні ін'єкції слід проводити в ділянці потилиці, у кролів та дрібних тварин – в зоні спини та боку, у морських свинок – переважно збоку. Оскільки підшкірний шлях введення дає можливість використовувати досить значні об'єми речовин, доцільно проводити ін'єкції в кількох місцях.

Внутрішньошкірне введення. Для цього шляху аплікації звичайно використовується задня частина спини тварини. На місці введення препарату видаляється шерсть. Цілісність покриву шкіри порушується шляхом нанесення подряпин голкою або наждачним папером (поява крові не допускається). На підготовану таким чином ділянку шкіри наноситься досліджувана речовина.

Внутрішньоочеревинне введення. Критерії токсичності, отримані при використанні даного шляху введення, близькі до отриманих при внутрішньовенній ін'єкції. Таке введення слід проводити з великою обережністю, щоб не ушкодити кишечник.

Інгаляційне введення. Інгаляційне введення досліджуваної речовини вимагає використання обладнання, здатного забезпечити динамічний потік повітря (12 – 15 змін на годину), 19 % вміст кисню та відповідний атмосферний тиск. При цьому загальний об'єм експериментальних тварин повинен складати не більше 5 % від загального об'єму камери. При використанні динамічної інгаляційної системи для аналізу концентрації досліджуваної речовини необхідна наявність відповідної контролюючої системи.

## 2.6. Реєстрація даних. Звіт

Збереження первинних даних експериментальних досліджень є необхідною умовою відтворення ходу випробувань при підготовці звіту. До первинних даних належать:

- робочі записи;
- зареєстровані дані;
- примітки, зроблені за даними оригінальних спостережень;
- листи з автоматичними записами;
- дані вимірювальних приладів;
- результати статистичного аналізу;
- фотографії;
- комп'ютерні записи;
- магнітні стрічки з надиктованими результатами спостережень, а також їх копії з датою дублювання та підписом відповідального виконавця. Всі дані, отримані при проведенні випробувань, повинні записуватись у попередньо підготовлені зошити або бланки одразу після проведення кожного конкретного експерименту, підписуватись та датуватись безпосередньо виконавцем.

Кінцевим результатом доклінічного дослідження речовини є звіт, в якому представлена інформація щодо безпечності речовини (лікарського засобу). Грунтуючись на даних випробувань, він відображає всі можливі сторони потенційної дії речовин. Звіт надається до відповідної установи (наприклад, стосовно лікарських препаратів таким органом є Державний фармакологічний центр МОЗ України) для експертної оцінки.

Обов'язковими елементами звіту є:

- ◇ назва та адреса установи, яка виконує випробування;
  - ◇ дати початку та завершення досліджень;
  - ◇ мета та завдання випробувань;
  - ◇ назва досліджуваної та контрольної речовин з наведенням хімічних формул та характеристик (стабільність, чистота, склад та ін.);
  - ◇ методи досліджень;
  - ◇ статистичні методи;
  - ◇ дані про тест-систему (вид, лінія, штамп, кількість використаних тварин або інших одиниць тест-системи, стать, вік, маса тіла, джерело постачання, методи розподілу по групах, процедура ідентифікації, фактори довкілля та умови утримання тварин);
  - ◇ дози, шляхи, способи, періодичність та тривалість введення досліджуваної та контрольної речовин;
  - ◇ особистий підпис заключного звіту керівником випробувань з указанням його прізвища, імені та дати підпису;
  - ◇ результати випробувань та їх обговорення, які, в залежності від об'єму досліджень, містять дані щодо:
    - ◇ токсичності в залежності від дози та статі;
    - ◇ термінів загибелі або забою на термінальній стадії;
    - ◇ клінічних проявів токсичності;
    - ◇ термінів виникнення токсичних проявів та їх тривалості;
    - ◇ вживання їжі та маси тіла;
    - ◇ результатів офтальмологічних досліджень;
    - ◇ гематологічних показників;
    - ◇ біохімічних параметрів сироватки крові та сечі;
    - ◇ результатів морфологічного огляду;
    - ◇ гістопатологічних спостережень.
- В кінці звіту приводять:
- ◇ висновки;
  - ◇ список використаної літератури;
  - ◇ реферат;
  - ◇ місце зберігання проб, зразків, первинних даних та заключного звіту;
  - ◇ висновок групи контролю якості випробувань.

### **3. Гостра токсичність**

#### ***3.1. Принцип методу досліджень***

При визначенні токсикологічних характеристик речовин (лікарських засобів) визначення гострої токсичності, як правило, є першим етапом, метою якого є одержання інформації щодо небезпечності досліджуваної речовини для здоров'я в умовах короткотривалої дії. Ці дані можуть братись за основу для визначення класу токсичності і є першим кроком до встановлення режимів дозування при проведенні досліджень підгострої, хронічної, специфічної токсичності та інших випробувань, а також надавати первинну інформацію про токсичну дію речовини або фармакологічного препарату.

Визначення параметрів гострої токсичності дозволяє отримати необхідну інформацію для вирішення наступних завдань:

- встановлення рівня токсичності досліджуваної фармакологічної речовини та отримання даних щодо його токсикодинаміки;
- визначення співвідношення між дозою та негативними ефектами;
- визначення видової та статевої чутливості лабораторних тварин щодо дії досліджуваної речовини;

- встановлення параметрів токсичності для визначення доз при проведенні підгострих та хронічних експериментів та дослідження спеціальних видів токсичності;
- порівняльна оцінка токсичності досліджуваної речовини з найактивнішим з існуючих прототипів або аналогом, які використовуються в практичній медицині.

Вирішення цих завдань вимагає визначення основних параметрів токсичності речовин, а саме: середньосмертельної дози та її стандартної помилки ( $DL_{50} \pm m$ ), максимально переносимої дози ( $DL_0$ ), а також  $DL_{16}$  та  $DL_{84}$ .

Дослідження гострої токсичності потенційних лікарських засобів необхідно проводити при трьох шляхах введення, серед яких обов'язковим є рекомендований для клінічного використання. Враховуючи можливість випадкових ситуацій, які спричиняють нещасні випадки, суїцидальні та кримінальні отруєння, доцільним є визначення гострої токсичності при пероральному шляху введення.

### 3.2. Процедура дослідження

#### Експериментальні тварини

Гостра токсичність нових речовин вивчається на трьох видах експериментальних тварин: двох видах гризунів та одному негризунів.

При дослідженні гострої токсичності необхідно, щоб кількість груп та тварин в кожній групі забезпечувала визначення вірогідності параметрів гострої токсичної дії та встановлення середньої смертельної дози. Для кожної дози повинно бути не менше 6 тварин кожної статі. В окремих випадках допускається визначення гострої токсичності на тваринах однієї статі з наступною перевіркою чутливості щодо досліджуваної речовини тварин протилежної статі (використовується одна доза); отримання достатніх даних про токсичність досліджуваної речовини в залежності від статі в даному випадку свідчить про можливість обмеження досліджень з використанням тварин протилежної статі.

#### Рівні доз

Вибір доз може базуватись на результатах попередніх пошукових досліджень. Кількість окремих дозових рівнів і проміжки між ними повинні забезпечувати можливість віднесення досліджуваної речовини за токсичністю до конкретного класу і бути достатніми для побудови кривої «доза – ефект» та визначення  $DL_{50}$ . Рекомендується використовувати 5 рівнів доз. За певних експериментальних умов будь-яка речовина, введена в досить великій кількості, здатна викликати токсичну дію. Тому лімітуючим показником при визначенні гострої токсичності є максимальна доза четвертого класу токсичності (малотоксичні речовини) з урахуванням шляху введення (табл. 8). Наприклад, для внутрішньошлункового введення ця доза складає 5 г/кг маси тіла. Якщо при цьому не спостерігається загибелі, введення більшої дози, як правило, є недоцільним. У разі, якщо має місце загибель тварин внаслідок дії досліджуваної речовини, необхідно проводити випробування у повному обсязі.

Таблиця 8

Класифікація речовин за токсичністю [20,21]

Клас токсичності	Ступінь токсичності	$DL_{50}$ , мг/кг маси тіла			
		внутрішньошлункове введення	нанесення на шкіру	підшкірне введення	внутрішньоочеревинне введення
I	Надзвичайно токсичні	< 1	< 5	< 0,3	< 0,2
II	Високотоксичні	1–50	5–43	0,4–15	0,3–10
III	Помірно токсичні	50–500	44–340	16–150	11–100
IV	Малотоксичні	500–5 000	350–2 810	151–1 500	101–1 000
V	Практично нетоксичні	5 000–15 000	2 820–22 590	15 01–4 500	1 001–3 000
VI	Відносно нешкідливі	> 15 000	> 22 600	> 4 500	> 3 000

Доза розраховується в мг або в мл досліджуваної речовини на 1 кг маси тіла експериментальних тварин. При необхідності, досліджувана речовина розчиняється або суспендується з використанням відповідного розчинника (носія), який вводиться контрольній групі тварин в адекватних об'ємах.

### **Підготовка та проведення експерименту**

Відібрані після карантину і попередньо індивідуально помічені тварини розподіляються на групи за методом випадкового вибору з використанням комп'ютерної програми або таблиці випадкових номерів. До введення досліджуваної речовини експериментальні тварини протягом не менше 5 днів мають пройти акліматизацію в умовах кімнати для проведення випробувань. Перед оральним введенням досліджуваної речовини тварини повинні голодувати: щури – протягом ночі, миші – 3–4 год. Потому їх зважують і вводять досліджувану речовину. Якщо за один раз неможливо ввести всю кількість речовини, необхідна доза може бути введена дрібно протягом періоду, що не перевищує 24 год. Після перорального введення допуск до їжі надається не раніше, ніж через 3–4 год, що також необхідно враховувати за умов дрібного дозування при забезпеченні тварин їжею та водою в проміжках між введеннями.

### **Тривалість спостережень**

Тривалість спостережень за станом тварини після одноразового (або багаторазового протягом 24 год) введення фармакологічної речовини складає не менше 14 днів. Але цей період не є жорстко фіксованим, оскільки визначається токсичними реакціями, швидкістю їх настання та тривалістю періоду відновлення, і, отже, при необхідності може бути пролонгований. Терміни виникнення та зникнення токсичних проявів, а також загибелі є важливими показниками, особливо за наявності відкладеної загибелі.

### **Спостереження за клінічними проявами інтоксикації**

Дослідження гострої токсичності зводиться не лише до визначення  $DL_{50}$ . Дуже важливою, особливо за відсутності загибелі тварин при вивченні малотоксичних речовин, є інформація, отримана на підставі реєстрації дозозалежного впливу на різні функції організму. Індивідуальна маса тіла тварин повинна визначатись незадовго до введення досліджуваної речовини, через 3, 7 діб після її введення та перед забоєм (загибеллю); зміни маси тіла необхідно реєструвати, якщо термін виживання перевищує один день після введення речовини. Систематична реєстрація показників стану кожної тварини повинна здійснюватись не рідше одного разу на день. Ці спостереження повинні включати реєстрацію інтегральних показників (загальний стан, зміни положення тіла, стан шкіри, колір слизових оболонок, температура тіла) та окремих симптомів (міоз, сльозоточивість, саливація, діарея, зміни кольору сечі та фекалій, сонливість, тремор, судоми та ін.). Інтерпретацію результатів клінічних спостережень подано в табл. 9 [8].

З метою мінімальної втрати тварин внаслідок капіталізму часто виникає необхідність огляду тварин частіше, ніж раз на день. Час загибелі тварин слід реєструвати якомога точніше. Тварин, знайдених мертвими, необхідно піддавати морфологічним дослідженням відразу або поміщати в холодильну камеру. Ослаблених або агонізуючих тварин слід ізолювати або забивати з використанням методів евтаназії.

### **Патоморфологічні дослідження**

Після забою (загибелі) тварин необхідно проводити їх розтин та здійснювати макроскопічні обстеження і опис внутрішніх органів, а також визначення відносної маси органів: серця, печінки, селезінки, нирок, надниркових залоз, простати, яєчків, яєчників, головного мозку, гіпофізу. Всі виявлені патологічні зміни реєструються і підлягають подальшому гістологічному дослідженню.

## **3.3. Обробка та оцінка одержаних результатів**

Необхідно пам'ятати, що летальність є лише однією з характеристик при визначенні гострої токсичності. Нахил кривої залежності відгуку від дози, терміни загибелі, фармако-токсикологічні ознаки, патоморфологічна картина є не менш, а іноді навіть більш важливими, ніж  $DL_{50}$  при вивченні небезпечності речовини.

## Клінічні прояви та їх інтерпретація при дослідженні гострої токсичності [8]

Клінічні спостереження	Ознаки, що спостерігаються	Органи, тканини та системи – вірогідні мішені впливу досліджуваної речовини
I. Дихання: затруднення носового дихання, зміна частоти, глибини дихання, зміна кольору шкіри	<p>А. Диспное: ускладнення дихання, особливо вдих повітря, як правило, частота дихання сповільнена</p> <p>1. Черевне дихання: діафрагмальне, переважає черевинний видих над вдихом</p> <p>2. Ядуха: глибока затримка вдиху, що супроводжується стенозним диханням</p> <p>Б. Апное: тимчасова зупинка дихання</p> <p>В. Ціаноз: синюшність хвоста, ротової порожнини та подушечок ніг</p> <p>Г. Тахіпное: прискорене та, в основному, поверхнєве дихання</p> <p>Д. Виділення з ніздрів: червоні або безбарвні</p>	<p>Порушення функцій дихального центру, параліч міжреберних м'язів, гальмування холінергічної системи</p> <p>Порушення функцій дихального центру, легеневий набряк</p> <p>Порушення функцій дихального центру, легенево-серцева недостатність</p> <p>Легенево-серцева недостатність, набряк легенів</p> <p>Стимуляція дихального центру, легенево-серцева недостатність</p> <p>Набряк легенів</p>
II. Рухова активність: зміни швидкості та природи рухів	<p>А. Зменшення або збільшення спонтанної рухової активності</p> <p>Б. Сонливість: тварини проявляють сонливість, але можуть бути розбуджені, проявляючи нормальну активність</p> <p>В. Втрата контрлатерального рефлексу</p> <p>Г. Анестезія: втрата больового рефлексу та больової чутливості (тварина не реагує на пощипування хвоста та пальців)</p> <p>Д. Каталепсія: тварина залишається в позі, яку їй надали</p> <p>Е. Атаксія: неспроможність контролювати та координувати рухи під час ходи за відсутності м'язової спастичності та парезів</p> <p>Є. Нетипові способи пересування: хода на пальцях, судомість, підскакування та ін.</p> <p>Ж. Прострація: нерухоість та положення на животі</p> <p>З. Тремор: дрижання тіла або окремих його частин</p> <p>І. Фасцикуляція: рухливість м'язів спини, плечей, задніх кінцівок та пальців ніг</p>	<p>Соматомоторні, ЦНС</p> <p>Центр сну ЦНС</p> <p>ЦНС, сенсорна та нервово-м'язова система</p> <p>ЦНС, сенсорна система</p> <p>ЦНС, сенсорна, нервово-м'язова, вегетативна системи</p> <p>ЦНС, сенсорна система</p> <p>ЦНС, сенсорна, нервово-м'язова системи</p> <p>ЦНС, сенсорна, нервово-м'язова системи</p> <p>ЦНС, нервово-м'язова система</p> <p>Нервово-м'язова, вегетативна системи, ЦНС</p>
III. Судоми: спостерігаються спонтанні скорочення м'язів	<p>А. Клонічні судоми: конвульсивні скорочення чергуються з розслабленням м'язів</p> <p>Б. Тонічні судоми: постійні скорочення м'язів, які супроводжуються стійким витягуванням задніх кінцівок</p> <p>В. Тоніко-клонічні судоми: можуть проявлятися послідовно обидва типи судом</p> <p>Г. Асфіксічні судоми: як правило, клонічного типу, але супроводжуються ядухою та ціанозом</p> <p>Д. Опістотонус: тетанічні спазми, при яких спина прогинається, і голова приймає дорсальне положення</p>	<p>ЦНС, недостатність дихання, нервово-м'язова, вегетативна системи</p>

Клінічні спостереження	Ознаки, що спостерігаються	Органи, тканини та системи – вірогідні мішені впливу досліджуваної речовини
IV. Офтальмологічні симптоми	А. Лакримация: надмірна сльозоточивість Б. Міоз: звуження зіниці незалежно від наявності або відсутності світла В. Мідріаз: розширення зіниці незалежно від наявності або відсутності світла Г. Екзофтальм: зміщення очного яблука вперед Д. Птоз: незворотне опущення верхніх повік Е. Хромодакриорея (червона лакримация)  Є. Релаксация мигальних перетинок Ж. Затемнення рогівки, запалення райдужної оболонки, кон'юнктивіти	Вегетативна система Вегетативна система  Вегетативна система  Вегетативна система  Вегетативна система  Вегетативна система (геморагії, інфекція) Вегетативна система Очі (запалення)
V. Серцево-судинні симптоми	А. Брадикардія: зменшення частоти серцевих скорочень Б. Тахікардія: збільшення частоти серцевих скорочень В. Вазодилатація: розширення судин, почервоніння шкіри, хвоста, язика, вух, подушечок ніг та підвищення температури тіла Г. Вазоконстрикція: звуження судин, побліднення шкіри, зниження температури тіла Д. Аритмія: порушення серцевого ритму	Вегетативна система, легенево-серцева недостатність Вегетативна система, легенево-серцева недостатність Вегетативна система, ЦНС, збільшення серцевого викиду  Вегетативна система, ЦНС, зменшення серцевого викиду ЦНС, вегетативна система, легенево-серцева недостатність, інфаркт міокарда
VI. Салівація	А. Надмірне виділення слини: зволоження шерсті навколо рота	Вегетативна система
VII. Пілоерекція	А. Скорочення м'язів волосяних фолікулів з підняттям шерсті	Вегетативна система
VIII. Аналгезія	А. Збільшення порога чутливості на індукований біль	Сенсорна та ЦНС
IX. Тонус м'язів	А. Гіпотонус: генералізоване зменшення м'язового тону Б. Гіпертонус: генералізоване збільшення м'язового тону	Вегетативна система  Вегетативна система
X. Показники стану шлунково-кишкового тракту (екскременти)	А. Кал: твердий та сухий  Б. Кал водянистий, зневоднення	Вегетативна система, порушення перистальтики (запор)  Вегетативна система, порушення перистальтики (діарея)
XI. Блювання	А. Блювання та потяги до блювання	ЦНС, сенсорна, вегетативна системи (у щурів блювання відсутнє)
XII. Діурез	А. Сеча червона Б. Спонтанне сечовиділення	Порушення функції нирок Вегетативна, сенсорна системи, ЦНС
XIII. Стан шкіри	А. набряк  Б. Еритема	Запалення, ниркова недостатність, тривала іммобілізація Запалення, подразнення, сенсibilізація



Результати випробувань можуть бути узагальнені у вигляді таблиць для кожної дослідної групи тварин із зазначенням дати та шляху введення досліджуваної речовини, термінів загибелі кожної тварини при різних рівнях доз, кількості тварин, у яких спостерігались ознаки токсичної дії, опис токсичних ефектів та висновки за результатами патоморфологічних досліджень.

Тварини, забиті з гуманних причин (біль, стрес та ін.), що виникли в результаті дії досліджуваної речовини, реєструються як такі, що загинули внаслідок токсичної дії досліджуваної речовини. Слід також окремо фіксувати випадкову загибель тварин, яка не пов'язана з дією досліджуваної речовини, а є, наприклад, результатом маніпуляційних помилок.

Методи визначення гострої токсичності можна розподілити на дві категорії. До першої належать експрес-методи, що використовуються з метою попередньої оцінки токсичності на стадії скринінгу, яка передує детальному вивченню нових лікарських засобів (субстанцій), при проведенні випробувань експертного характеру (напр., порівняльні випробування генеричних препаратів), а також в дослідях з використанням великих (свині, собаки) або дорогих (мавпи) тварин [9- 16]. Вони дають змогу визначити  $DL_{50}$  з використанням обмеженої кількості тварин, але ставлять високі вимоги до стандартизації тест-системи, оскільки індивідуальний стан та чутливість окремих тварин до досліджуваної речовини можуть суттєво впливати на результати досліджу.

Найбільш універсальним та таким, що дозволяє отримувати порівняно повну інформацію, незважаючи на ряд недоліків (напр. необхідність великої кількості тварин), є метод пробіт-аналізу з використанням математичних розрахунків [17, 18] або графічного способу згідно з Litchfield та Wilcoxon [19]. Останній є графічно ілюстративним і дає можливість значно ширшої інтерпретації одержаних результатів.

#### *Оцінка отриманих результатів*

Дослідження гострої токсичності та встановлення  $DL_{50}$  дозволяє отримати відомості щодо:

- класу токсичності фармакологічної речовини (табл. 8);
- загальної інформації щодо токсикодинаміки та токсикокінетики;
- порівняльної характеристики параметрів токсичності фармакологічної речовини та прототипу (або аналога) шляхом співставлення їх  $DL_{50}$ , зон токсичної дії, кривих залежності летальності від дози;
  - відносної токсичності речовини в залежності від шляху надходження до організму, вимоги та статевої чутливості;
  - дозозалежних ефектів;
  - характеру функціональних порушень та морфологічних змін;
  - можливого механізму дії;
  - умов подальшого визначення підгострої, хронічної токсичності (вид тварин, дози, терміни, шляхи введення, спосіб введення) та напрямки поглибленого вивчення.

При прогнозуванні токсичної дії досліджуваної речовини значно важливішим та показовішим порівняно з показником  $DL_{50}$  є нахил кривої «логарифм дози – ефект». Іноді нахил кривої може давати ключ до розгадки механізму токсичної дії, вказуючи на швидкість початку токсичної дії або швидкість адсорбції. Плоска крива свідчить про наявність значного запасу безпечності. Часто крива дає змогу робити екстраполяцію відгуку на низькі дози (напр.,  $DL_{10}$ ,  $DL_1$ ). Це особливо важливо при порівнянні речовин, які мають однакові величини  $DL_{50}$ , але різні нахили кривої, що є свідченням абсолютно різних токсикологічних характеристик. Паралельність дозозалежних кривих може вказувати на подібність механізму токсичної дії, кінетичної моделі та прогнозу. Для потенційних лікарських засобів дуже важливою є кількісна характеристика взаємовідношення між виявленим токсичним ефектом та специфічною терапевтичною дією і іншими фармакологічними параметрами. Найпоширенішим є визначення так званого «терапевтичного індексу», який розраховується за співвідношенням  $DL_{50}/DE_{50}$ . Індекс Brock та Schneider розраховується як відношення  $DL_5/DE_{95}$  [22].

Терапевтичні індекси можуть визначатись не лише за летальною дозою, а й за іншими токсичними та фармакологічними ефектами, наприклад, гепатотоксичністю, нейротоксичністю та терапевтичною або профілактичною дією, а також фармакокінетичними параметрами (від-

ношення концентрації препарату в плазмі, яка викликає побічні ефекти, до концентрації, що проявляє терапевтичну дію). Якщо співвідношення терапевтичного індексу досліджуваного та стандартного препаратів (відносний індекс) за умов досліджень з використанням різних моделей близькі, то даний засіб може використовуватись в клінічній практиці.

Крім показників, вказаних вище, при проведенні скринінгу біологічно активних речовин та їх доклінічному токсикологічному дослідженні розраховується «коефіцієнт небезпечності», який вказує на ризик або можливість токсичної дії дози, що проявляє терапевтичний ефект у 90 – 95 % експериментальних тварин [23].

Перераховані вище параметри гострої токсичності надають необхідну інформацію щодо безпечності потенційного лікарського засобу та дозволяють прогнозувати ризик виникнення негативних ефектів на стадії клінічних випробувань.

### **4. Токсичність при повторних введеннях**

#### **(Підгостра, субхронічна та хронічна токсичність)**

##### **4.1. Загальні положення**

Незважаючи на те, що за даними гострої токсичності досліджувана речовина може не проявити ознак токсичності, пролонговане її введення, навіть в низьких дозах, часто здатне привести до розвитку інтоксикації внаслідок накопичення в організмі, метаболічних змін, порушення гомеостазу. Дослідження можливої небезпеки для здоров'я повторних введень речовини, що вивчається, проводиться на підставі первинної інформації, отриманої в гострому експерименті.

Дослідження *підгострої токсичності* передбачає одержання даних щодо токсичної дії речовини внаслідок введення її до тест-системи протягом обмеженого часу.

Метою *субхронічних досліджень* є визначення шкідливої дії повторних введень протягом певної частини тривалості життя експериментальних тварин. Належне планування субхронічного дослідження дає змогу одержувати цінну інформацію щодо кумулятивних властивостей речовини, впливу на органи та системи, а також переносимість даної речовини при певних (порівняно з гострою токсичністю) дозах за умов її введення протягом періоду, який не перевищує 10 % тривалості життя відповідного виду експериментальної тварини. Завдяки моніторингу різноманітних параметрів, включаючи гістопатологічний аналіз, ці дослідження дозволяють виявити різноманітні прояви шкідливої дії, а також визначити дози для вивчення хронічної токсичності, канцерогенності та впливу на репродуктивну функцію організму. Вважається, що дані субхронічної токсичності можуть бути достатніми для передбачення небезпечності тривалого введення окремих речовин в низьких дозах.

Необхідність вивчення *хронічної токсичності* визначається двома обставинами: по-перше, дослідження токсичних ефектів внаслідок проведення тривалих випробувань, а, по-друге, виявлення рівнів доз, при яких не спостерігається токсична дія за даних умов експерименту. На відміну від досліджень канцерогенності, які призначені для встановлення потенційних можливостей пухлиноутворення, вивчення хронічної токсичності використовує підходи до визначення природи шкідливої дії та включає визначення межі безпечності дози, запропонованої для медичного використання.

Результати вивчення хронічної токсичності на тваринах мають попередньо виявити прояви та симптоми шкідливої дії для людини, тому такі дослідження є обов'язковими для лікарських засобів:

- ◊ оригінальних, тобто створених з використанням нових активних субстанцій або новою якісною (кількісною) комбінацією відомих активних субстанцій;
- ◊ відтворених за ліцензійною технологією;
- ◊ з новими допоміжними речовинами;
- ◊ з відтвореними допоміжними речовинами;
- ◊ гомеопатичних.

## 4.2. Процедура дослідження

### Експериментальні тварини

Токсичність нових речовин при повторних введеннях вивчається на двох видах експериментальних тварин: гризунах та негризунах обох статей. Найчастіше використовуються білі щури та собаки. Однак вибір може визначатись інформацією про найбільшу видову чутливість до досліджуваної фармакологічної речовини. Шлях введення повинен відповідати тому, який буде використовуватись при клінічному вивченні або бути максимально наближеним до нього.

Для проведення субхронічних та хронічних випробувань токсичності краще використовувати молодих тварин.

При субхронічних та хронічних випробуваннях необхідна така кількість тварин, яка б відповідала завданню визначення токсичної дії, враховуючи дослідження механізмів токсичності та визначення неефективних рівнів. При розрахунках кількості тварин в групі слід враховувати можливість загибелі їх в ході експерименту та необхідність проведення проміжних забоїв відповідно до протоколу випробувань. На період завершення експерименту має залишитись достатня кількість тварин для проведення повної біологічної оцінки. Крім того, для вивчення оборотності токсичного ефекту після закінчення повторних введень кожна з досліджуваних груп має включати додаткову кількість тварин, які підлягають забою та дослідженню за повною програмою після відновлювального періоду (2 – 4 тижні). Ряд показників (гематологічні та біохімічні сироватки крові) мають бути визначені до початку введення досліджуваної речовини. Стосовно гризунів для кожного рівня доз повинно бути не менше 10 – 20 тварин кожної статі. При дослідженні токсичності на вищих у порівнянні з гризунами видах число тварин на кожную дозу повинно бути не менше 6 – 8 кожної статі.

### Тривалість випробувань

Тривалість повторного введення потенційного фармакологічного засобу при проведенні токсикологічних досліджень може варіювати залежно від тривалості його використання в клінічній практиці [24].

<u>Тривалість використання в клініці</u>	<u>Тривалість повторних введень при вивченні токсичності</u>
Одноразове введення або кілька доз протягом однієї доби	14 діб
Повторні введення до 7 діб	28 діб
Повторні введення до 30 діб	3 місяці
Повторні введення понад 30 діб	6 місяців

Досліджувана речовина (фармакологічний засіб) вводиться щоденно.

Дослідження підгострої токсичності передбачає введення досліджуваної речовини протягом 14 або 28 днів, тривалість субхронічного експерименту, як правило, не перевищує 10 % середньої тривалості життя тварин і, наприклад, для гризунів складає 90 діб.

Класичні хронічні випробування на щурах та мишах передбачають щоденні введення досліджуваної речовини протягом 6 місяців. Для негризунів цей термін складає 1 рік.

### Рівні доз

При повторних введеннях досліджувана речовина вивчається у трьох дозах (за винятком нашкірного шляху введення, при якому з огляду на труднощі досягнення токсичного ефекту можна обмежитись двома дозами): умовно терапевтичної (мінімальна), максимальної для виявлення передбачуваної токсичності (часто ця доза не менше, ніж в 10 разів, перевищує терапевтичну, якщо дозволяє широта терапевтичної дії) та проміжної між мінімальною та максимальною.

Визначення рівнів доз для нових речовин (субстанцій) представляє одну з найскладніших проблем і ґрунтується на даних гострої, підгострої токсичності та результатах фармакологічних досліджень. В деяких випадках вибір доз може визначатись фіксованими частинами  $DL_{50}$ .

Одним із шляхів визначення доз для проведення хронічного експерименту можуть бути популярні дослідження протягом 90 днів (субхронічна токсичність) з використанням одного або кількох показників системного відгуку на введення досліджуваної речовини. Вибір такого показника (або показників) має ґрунтуватись на загальнотоксикологічних параметрах: живання їжі та води, маса тіла, внутрішніх органів, фізична витривалість, стан біоенергетичних процесів, перекисне окислення ліпідів, а також даних метаболізму та фармакокінетики. Вибір показника визначається за експериментальними та літературними даними щодо механізму дії речовини, яка випробовується, а також результатами вивчення гострої та підгострої токсичності. Найбільша доза, яка, не призводячи до загибелі тварин, викликає статистично вірогідні зміни визначеного параметра порівняно з контролем, вважається максимально переносимою і визначається як максимальна (часто таким критерієм є зниження маси тіла на 10 %). Доза речовини, яка не викликає будь-яких проявів токсичної дії, вважається мінімальною. Середня доза має викликати незначні прояви токсичності. Іноді при вивченні хронічної токсичності 1/4 та 1/16 частини від максимальної дози використовуються відповідно як середня та мінімальна.

Для малотоксичних речовин, середньосмертельні дози яких встановити неможливо, найвища доза для хронічного експерименту обирається з урахуванням фармакологічних особливостей речовини та технічних можливостей введення максимально допустимих кількостей (див. табл. 5).

Крім дослідних груп для кожної статі формується контрольна група тварин, яким вводиться розчинник (носії);

### **Спостереження**

Токсична дія досліджуваної речовини базується на визначенні дозозалежного ефекту шляхом реєстрації специфічних та неспецифічних симптомів інтоксикації, клінічної картини її розвитку, перебігу та наслідків. Детальні спостереження за фізичним станом, щоденні огляди, офтальмологічні дослідження, реєстрація споживання їжі та води, маси тіла кожної тварини проводяться щоденно. Вони повинні включати реєстрацію змін шкіри, очей, шерсті, слизових оболонок, температури тіла, частоти дихання, а також поведінки тварин (табл. 8). Особливу увагу слід приділити пальпації для виявлення пухлиноутворення. Всі ознаки токсичності повинні бути зареєстровані. Забиті та померлі тварини підлягають патоморфологічному та патоморфологічному дослідженню.

Заплановані забори передбачають зважування органів, гематологічні, біохімічні та патоморфологічні дослідження.

### **Патоморфологічні дослідження**

Одним з найважливіших аспектів в токсикологічних дослідженнях є посмертні макроскопічні дослідження. Вони передбачають огляд зовнішнього стану, наприклад, охайність шерсті, її колір та стап, локалізацію та розміри уражень, стан м'язів. Розтин експериментальних тварин повинен виконуватись досвідченим патоморфологом. Для виявлення ушкоджень та відхилень від норми необхідно проводити огляд всіх органів. По можливості, ураження мають бути сфотографовані (особливо невеликі новоутворення) та виміряні. Для максимального запобігання аутолізу тканини якомога швидше слід внести в 10 % розчин формаліну для фіксації (для деяких тканин необхідна спеціальна фіксація).

### **Маса органів**

Зважування органів піддослідних тварин є одним з елементів токсикологічного дослідження, яке спрямоване на виявлення органа-мішені. У хронічних дослідженнях зважуванню підлягають: печінка, серце, нирки, селезінка, гонади, мозок, надниркові та щитовидна залози, тимус (з мінімальним інтервалом після забою).

Печінка, селезінка, нирки, яєчка, як правило, вилучаються без ускладнень. Вилучення серця може супроводжуватись захопленням частини судин, до того ж воно може містити кров, що додасть ваги органу. Тому необхідно пересвідчитись у відсутності в передсердях, шлуночках, на клапанах та ендокарді залишків крові.

В той час, як більшість органів є дискретними, мозок продовжується в хребетний стовбур. Тому, з метою зменшення розбіжностей маси, процедура вилучення цього органа має бути стандартизована. Зокрема, перед вилученням черешної коробки спинний мозок повинен бути відділений від головного на з'єднанні з атлантом. Таким способом мозок відсікається щоразу в одному місці.

*Надпиркові залози* гризунів за кольором подібні до прилеглого жиру. Вилучення та зважування цього органа тварин різних груп має виконувати одна особа з метою попередження розбіжностей, обумовлених відмінностями в процедурі.

*Щитоподібна залоза* гризунів – маленький орган, який за кольором схожий на оточуючі його м'язи. Подібно до надпиркових залоз, вилучення щитовидної залози вимагає обережності та досвіду.

Після визначення маси органів необхідно розрахувати їх масові коефіцієнти.

Всі органи та тканини підлягають гістологічному дослідженню. У токсикології, звичайно, використовується фарбування гематоксиліном та еозином. Дані гістологічного вивчення співставляються з біохімічними та гематологічними показниками.

### **Біохімічні дослідження сироватки крові**

Біохімічні дослідження включають аналіз показників функціонування окремих органів (табл. 10), що дуже важливо для визначення органа-мішені токсичної дії. При цьому використовується плазма та сироватка крові. При взятті проб крові лаборант повинен відрізнити артеріальну кров (яскраво-червону) від венозної (темно-червоної). Змішування артеріальної та венозної проб крові призводить до додаткових помилок. Взяття крові проводиться після голодування, термін якого для більшості видів тварин становить 12 – 14 годин. Миші, які мають значно більшу швидкість метаболізму, повинні голодувати протягом 3 – 4 годин.

Судини для взяття крові у тварин наведено у табл. 11.

При взятті крові слід запобігати травмуванню тварин та стресу, які можуть негативно вплинути на досліджувані показники. Це обумовлює необхідність використання в окремих випадках анестезії (табл. 11). При виборі анестетиків слід враховувати, що деякі з них є індукторами мікросомальних ферментів, і це, в свою чергу, може впливати на досліджувані показники. Поширеним анестезуючим агентом для гризунів є 70 % двоокис вуглецю, використання якого створює мінімум проблем. Тривалість його дії для щурів та мишей становить 15 – 45 с в залежності від маси тіла тварини, при цьому необхідно слідкувати за кольором слизових оболонок та вух, які в разі глибокої гіпоксії змінюються з яскравофіолетового до темнофіолетового кольору.

Окремі біохімічні та гематологічні дослідження крові вимагають використання антикоагулянтів.

### **Аналіз сечі**

Аналіз сечі, так само, як крові та лімфи, проводиться для визначення впливу досліджуваної речовини на органи тварин. Зіб-

Таблиця 10

*Деякі біохімічні показники сироватки крові, які характеризують функціональний стан органів [8]*

Серце	Креатинкіназа та ізоферменти Лактатдегідрогеназа та ізоферменти
Печінка	Аланінамінотрансфераза Альбумін Лужна фосфатаза Аспаргатамінотрансфераза Білірубін Гама-глутамілтрансфераза Лактатдегідрогеназа та ізоферменти Сорбітолдегідрогеназа Загальний білок
Нирки	Хлориди Креатинін (сечі та сироватки) Глюкоза Калій Білок (сечі та сироватки) Натрій Азот сечовини
Підшлункова залоза	Амілаза Глюкоза Ліпаза Кальцій

Судини та інструментарій для забору крові у тварин

Вид тварин	Судини	Інструментарій	Необхідність анестезії
Собаки	Вена голови (лобна) Яремна вена (шия) Підшкірна вена задньої ноги	Голка 18-20 розмір, 2,5 см	Ні
Кролі	Серце Вена або артерія вуха Яремна вена	Голка 18-20 розмір, 5 см Голка 23-25 розмір, 1,8 см Голка 20-22 розмір, 2,5 см	Так Ні Ні
Щури, миші та інші гризуни	Орбітальний синус Яремна вена Артерія стегна Хвостова вена Нижня пола вена Пункція серця	Капіляр Голка 20-23 розмір, 1,8-2,5 см Голка 20-23 розмір, 1,8-2,5 см Надріз або голка 23 розмір, 1,8 см Голка 20-22 розмір, 2,5 см Голка 20-22 розмір, 2,5 см	За необхідністю Так Так За необхідністю Так Так

рана з використанням метаболічних кліток сеча аналізується за показниками кольору, мутності, рН, питомої ваги, мікроскопії осаду.

Крім того проводяться біохімічні дослідження сечі за такими показниками: наявність та кількість білка, цукру, кетонів, білірубину, уробіліногену, іонів натрію та калію.

#### **Гематологічні дослідження**

Гематологічні аналізи повинні включати гематокрит, концентрацію гемоглобіну, кількість еритроцитів та лейкоцитів (загальна та диференціальна), морфологію та резистентність еритроцитів, визначення показників згортання крові. Слід звертати увагу на зміни формули, виникнення незрілих форм або патологічних елементів. Зміни відносної кількості з боку одного або більше елементів білої крові може вказувати на значні порушення. Наприклад:

1. **Нейтрофіли.** Зростання кількості супроводжує гостру інфекцію, некроз тканин, гемоліз, судоми.

2. **Лімфоцити.** Відносна кількість зростає при гострих та хронічних інфекціях, гепатитах та недостатньому харчуванні.

3. **Базофіли.** Понижені при гіпертиреозидизмі.

4. **Еозинофіли.** Зростають при алергії, запаленнях, злоякісній анемії та деяких отруєннях, наприклад, фосфорорганічними речовинами.

5. **Моноцити.** Кількість зростає при протозойних інфекціях та деяких видах отруєнь, зокрема, тетраклоретаном.

#### **Інші показники**

Досліджуються також показники, які характеризують функціональний стан життєво важливих органів та систем, зокрема параметри електрокардіографії, частота дихання, в ряді випадків – тиск крові, енцефалографія, стан нервової системи, функціональні проби печінки та нирок.

На підставі результатів дослідження токсичності при багаторазовому введенні досліджуваної речовини визначається картина інтоксикації, а в разі наявності випадків загибелі тварин визначаються параметри хронічної токсичності, включаючи  $DL_{50}$ .

### **4.3. Статистична обробка та екстраполяція одержаних даних**

Всі кількісні та якісні показники, зареєстровані в результаті досліджень токсичності речовини при багаторазових введеннях, підлягають статистичній обробці з використанням загальноприйнятих методів [24, 25]. Розрахунок дозозалежних ефектів та токсодоз, показників  $DE_{50}$ ,  $DL_{50}$  та інших проводиться методом J.T. Litchfield та F. Wilcoxon [19]. Якщо відповідні статистичні показники виявляють вплив речовини на досліджувані параметри, ефект може бути незначущим [26], оскільки результати можуть вклатись в межі варіабельності даного параметра [27–29], що історично спостерігається. Це необхідно враховувати при інтерпретації одержаних результатів [30].

Міжвидова екстраполяція даних та перенесення їх на людину є досить відповідальним моментом [31, 32]. Разом з тим відомо [33], що біологічна активність більшості лікарських засобів відносно відповідного класу ссавців може визначатись певною константою. Константа біологічної активності ( $K_a$ ) розраховується за формулою:

$$K_a = \frac{R}{DL \text{ (або DE)}}$$

де: R – коефіцієнт видової стійкості; DL – величина летальних доз;

DE – ефективна доза речовини.

Коефіцієнт видової стійкості для різних видів ссавців розраховується за формулою:

$$R = \frac{Q \cdot Y}{K_c}$$

де: Q – основний обмін в ккал/кг · год;

Y – ударний об'єм крові в л/кг · год;

$K_c$  – коефіцієнт церебрації, який дорівнює відношенню маси мозку (в грамах) до маси тіла (в кілограмах).

Показники для визначення коефіцієнта видової стійкості наведено у табл. 12.

Таблиця 12

**Показники для визначення коефіцієнта видової стійкості**

Вид	Основний обмін (Q), ккал/кг · год	Ударний об'єм крові, (Y) л/кг · год	Маса мозку, г	Маса тіла, кг	Коефіцієнт церебрації ( $K_c$ )	Коефіцієнт видової стійкості (R)
Людина	1,07	3,77	1400	70	20,0	0,45
Собаки	1,46	8,70	150	15,0	10,0	1,13
Щури	3,46	10,71	2,6	0,250	10,4	1,89
Миші	7,13	12,0	0,27	0,022	12,3	2,64
Кролі	1,88	10,56	16	2,5	6,4	1,76

#### **4.4. Розробка заходів щодо експериментальної терапії інтоксикації, викликаній передозуванням фармакологічної речовини**

Підґрунтям для проведення експериментальних досліджень є дані про токсичну дію фармакологічної речовини при її передозуванні, тобто у випадку надходження до організму доз, які перевищують спрогнозовану добову або курсову дозу. Розробка включає:

- отримання даних про гостре отруєння досліджуваною фармакологічною речовиною, визначення характеру токсичної дії та основних ланок механізму розвитку інтоксикації, впливу на основні функціональні системи організму;
- проведення експериментального лікування інтоксикації з використанням антидотів, засобів патогенетичної та симптоматичної терапії;
- визначення основних лікувальних заходів, переліку фармакологічних засобів та маніпуляцій з метою терапії інтоксикації досліджуванім фармакологічним засобом у разі його передозування.

Для малотоксичних та практично нетоксичних речовин надається довідка про неможливість розвитку інтоксикації.

#### **4.5. Звіт**

Основні елементи звіту наведено у розділі 2.6. У звіті повинні бути представлені параметри хронічної токсичності, коефіцієнт кумуляції, визначені зони токсичної дії та дози, які не викликають шкідливих ефектів. Відносну кількісну оцінку можливого хронічного отруєння з

урахуванням найбільш чутливого виду тварин може бути проведено відповідно до градації небезпечності трьох доз препарату, досліджених в хронічному експерименті (табл. 13).

Таблиця 13 Одержані результати по-

**Критерії небезпечності [34]**

Коефіцієнт кумуляції [35]	Дозовий рівень шкідливої дії речовини в експерименті	Ступінь небезпечності хронічного отруєння
1 - 5	1DE <sub>50</sub>	високонебезпечно
5 - 10	5DE <sub>50</sub> - 10DE <sub>50</sub>	помірно небезпечно
>10	>10DE <sub>50</sub>	малонебезпечно

даються у вигляді таблиць з їх описом та мають завершуватись обговоренням відповідно до сучасних уявлень про критерії небезпечності в токсикології: співставлення виявлених змін з контролем, дозозалежність характеру

порушень, вихід зареєстрованих показників за межі фізіологічної норми, оборотність змін при вивченні відновлювального періоду і т.д.

У висновку на основі проведених досліджень повинні бути представлені: точка зору дослідників щодо рівня небезпечності отруєння при тривалому введенні, прояви токсичності у разі передозування та способи їх усунення, прогноз можливих побічних реакцій та необхідних обмежень та застережень при проведенні клінічних випробувань. При оцінці результатів тривалих випробувань (підгострої, субхронічної та хронічної токсичності) необхідно дотримуватись чотирьох правил [35]:

1. Оцінка експериментальних даних при багаторазовому введенні досліджуваної речовини повинна бути логічною і базуватись на досконалих знаннях матеріалу, що досліджується.
2. Після завершення експерименту аналізувати можна лише статистично оброблені показники.
3. Експеримент має проходити так, ніби кожен день є першим днем випробувань.
4. Отримані експериментальні дані будь-хто інший може точно повторити.

## Література

1. Commission of the European Communities: Council Directive of 18 December 1986 on the Harmonization of the Laws, regulating the Application of Principles of Good Laboratory Practice and the Verification of Their Applications for Tests on Chemical Substances (87/18/EEC). The Rules Governing Medicinal Products in the European Community, 1991.– V. 1.– P. 145–146.
2. Commission of the European Communities, Decision of the Council Concerning Mutual Acceptance of Data in the Assessment of Chemicals. Annex 2. OECD Principles of Good Laboratory Practice. In: Guidelines on the Quality, Safety and Efficacy of Medicinal Products in the European Community, 1991.– V. 3.– P. 227–248.
3. Stark D.M., Ostrow M.E. Training Manual Series Assistant Laboratory Animal Technician. – American Association for Laboratory Animal Science, 1991.– V.1.– P. 188.
4. Guide to the Care and Use of Experimental Animals.– Canadian Council on Animal Care.– Ottawa, 1984. – P. 120
5. Stark D.M., Ostrow M.E. Training Manual Series. Laboratory Animal Technician.– American Association for Laboratory Animal Science, 1990.– V.2.– P. 214.
6. Саноцкий И.В. Методы определения токсичности и опасности химических веществ.– М.: Медицина, 1970.– 343 с.
7. Лабораторные животные. Разведение, содержание, использование в эксперименте/ И.П. Западнюк, В.И. Западнюк, Е.А. Захария, Б.В. Западнюк.– К.: Вища шк., 1983.– 383 с.
8. Hayes A.W. Principles and Methods of Toxicology.– New-York: Raven Press, 1989.– 899 p.
9. Brownlee K.A., Hodges J.L., Rosenblatt M. The up-and-down method with small samples// J. Am. Statist. Assoc.– 1953.– V.48.– P. 262–277.
10. Choi S.C. An investigation of Wetherill's method of estimation for the up-and-down experiment//Biometrics.– 1971.– V.27.– P. 961–970.



11. Dixon W.J. The up-and-down method for small samples//J. Am. Statist. Assoc.– 1965.– V.60. – P. 967–978.
12. Deichman W.B., Le Blanc T.J. Determination of the approximate lethal dose with about six animals//J. Indust. Hyg. Toxicol.– 1943.– V.25, №9.– P. 415–417.
13. Пастушенко Т.В., Маруший Л.Б., Жуков А.А., Пилипенко Ю.А. Экспресс-метод для определения среднесмертельных доз химических веществ//Гиг. и сан.– 1985.– №6.– С. 46–47.
14. Thompson W.R. Use of moving average and interpolation to estimate median effective dose//Bacteriol. Rev.– 1947.– V.11.– P. 115–145.
15. Weil C.S. Tables for convenient calculation of median-effective dose ( $LD_{50}$  or  $ED_{50}$ ) and instruction in their use//Biometrics.– 1952.– V.8.– P. 249–263.
16. Dunnett C.D. Biostatistics in pharmacological testing//Selected Pharmacological Testing Methods/Ed. by A. Burger.– London: Edward Arnold, 1968.– P. 7–48.
17. Finney D.J. Probit Analysis.– 3rd edition, chapt. 3 and 4.– Cambridge: Cambridge University Press, 1971.
18. Прозоровский В.Б. Табличный экспресс-метод определения средних эффективных мер воздействия на биологические объекты//Токсикол. вестн.– 1998.– №1.– С. 28–32.
19. Litchfield J.T. Wilcoxon F. A simplified method of evaluating dose-effect experiments//J. Pharmacol. Exp. Ther. – 1949.– V. 96.– P. 99–115.
20. Hodge H.C., Sterner L.H.//Am. Industr. Hyg. Ass. Quart.– 1943.– V.10, №4.– P. 93.
21. Сидоров К.К. Токсикология новых промышленных химических веществ.– М.: Медицина, 1973.– Вып. 3.– 47 с.
22. Schneider B. Arzneimittelsicherheit und therapeutischer Index. Prinzipielles pharmakologisches Screenings und der Übertragbarkeit tierexperimentelle Ergebnisse auf die Klinik//Arzneim. Forsch.– 1982.– Bd.32, №5.– S. 471–474.
23. Порядок видачі дозволу на використання та впровадження у виробництво лікарських засобів//Наказ МОЗ України № 152 від 18.08.1995 р.
24. Бессмертный Б.С. Математическая статистика в клинической, профилактической и экспериментальной медицине.– М.: Медицина, 1967.)
25. Колодяжный В.И. Белоус А.К.//Фармакология и токсикология.– К., 1980.– Вып.15.– С. 103–113.
26. Gart J.J., Chu K.C., Tarone R.E. Statistical issues in interpretation of chronic bioassay tests for carcinogenicity//J. Natl. Cancer Inst.– 1979.– V.62.– P. 957–974.
27. Трахтенберг И.М., Тимофеевская Л.А., Квятковская И.Я. Методы изучения хронического действия химических и биологических загрязнителей.– Рига: Зинатне, 1987.
28. Трахтенберг И.М., Сова Р.Е., Шефтель В.О., Оникиенко Ф.А. Показатели нормы у лабораторных животных в токсикологическом эксперименте.– М., 1978.– 175 с.
29. Трахтенберг И.М., Сова Р.Е., Шефтель В.О., Оникиенко Ф.А. Проблемы нормы в токсикологии. – М., 1991.– 208 с .
30. Haseman J.K., Huff J., Boorman G.A. Use of historical control data in cancerogenicity studies in rodents//Toxicol. Pathol.– 1984.– V.12. – P. 126–135.
31. Красовский Г.Н. Собинякова О.Р.//Гиг. и сан.– 1970.– №4.– С. 29–34.
32. Красовский Г.Н., Шиган С.А. Обоснование оптимальной схемы исследований по выявлению кумулятивных свойств веществ//Научно-технический прогресс и профилактическая медицина.– М., 1971.– Ч.1.– С. 84–88.
33. Рыболовлев Ю.П., Сидяров Д.П., Афонин Н.И.//Токсикологические аспекты безопасности готовых лекарственных форм.– М., 1982.– С. 9.
34. Шефтель В.О., Сова А.Е. Применение математических методов для оценки и прогноза реальной опасности накопления пестицидов во внешней среде и организме.– К., 1976.– С. 37–38.
35. Stevens K.R., Gallo M.A. Practical considerations in the conduct of chronic toxicity studies//Principles and Methods in Toxicology/Ed. by A.W.Hayes.– New York: Raven Press, Ltd., 1989.– P. 237–250.

## **ВИВЧЕННЯ КУМУЛЯТИВНИХ ВЛАСТИВОСТЕЙ ЛІКАРСЬКИХ ЗАСОБІВ ПРИ ДОКЛІНІЧНИХ ДОСЛІДЖЕННЯХ**

Трахтенберг І.М.,  
Кокшарьова Н.В.,  
Шушуріна Н.О.

### **Вступ**

Небезпечність для людини хімічних речовин взагалі і лікарських засобів зокрема значною мірою пов'язана з їх здатністю до кумуляції в організмі. Визначення ступеня кумулятивної дії лікарського засобу дозволяє за відносно малий термін дослідження прогнозувати для досліджуваного лікарського засобу потенційну можливість викликати у людини хронічне отруєння. У відповідності до наказу МОЗ України №152 від 18.08.1995 р. «Про затвердження Порядку видачі дозволу на використання і впровадження у виробництво лікарських засобів», а також наказу МОЗ України №220 від 19.09.2000 р. «Про затвердження Порядку проведення експертизи матеріалів на лікарські засоби, що подаються на державну реєстрацію» визначення кумулятивних властивостей має бути проведено для лікарських субстанцій, а також лікарських препаратів таких груп:

- (I) – препарати з новими фармакологічними субстанціями;
- (III) – відомі препарати з принципово новими підходами до дозування;
- (VI) – препарати комбіновані, які вміщують дві та більше відомих фармакологічних субстанцій;
- (VII) – препарати комбіновані, які, поряд з відомими, вміщують нові фармакологічні речовини.

Для оцінки фармакологічних субстанцій та препаратів I і VII груп визначення і оцінка кумулятивних властивостей є обов'язковими. Що стосується препаратів III і VI груп, визначення кумулятивних властивостей проводять при необхідності.

Так, для препаратів III групи доцільно оцінювати кумулятивні властивості, якщо пропонується підвищення разових, добових та курсових доз, а також при інтермітуючих схемах призначення (підвищення-зниження доз протягом курсу лікування) і т. ін.

Для препаратів VI групи необхідно передбачати можливий вплив фармакологічних субстанцій одна на одну в плані кумуляції.

### **Загальні положення**

Поняття про кумуляцію бере свій початок саме з фармакології, воно було пов'язане з формуванням токсичного ефекту при повторному прийомі терапевтичних доз ліків. Кумуляція означає додавання (сумацію) дії повторних доз речовини, коли наступна доза потрапляє в організм раніше, ніж закінчується дія попередньої дози.

Розрізняють кумуляцію матеріальну і функціональну. Якщо в організмі накопичується сама речовина, при цьому все більша кількість речовини приймає участь в розвитку токсичного

процесу (на відміну від безсимптомного отрутоносійства) – говорять про матеріальну кумуляцію. У тому разі, коли посилення кінцевого токсичного ефекту при додаванні нових доз речовини пов'язане не з накопиченням речовини, а з сумациєю функціональних токсичних ефектів в організмі – говорять про функціональну кумуляцію.

Поняття про матеріальну і функціональну кумуляцію базується на знанні інтимних механізмів дії речовин. При цьому відіграють свою роль кінетика переносу і метаболізму речовин, взаємодія з рецепторами, кінетика ферментативного каталізу та інші аспекти первинної токсикологічної реакції, а також патогенетичні зв'язки між первинними і похідними (вторинними, третинними і т.д.) ефектами.

Первинна дія токсичних речовин відбувається у процесі контакту молекул ксенобіотика з рецепторами і може призводити до їхньої блокади, інактивації, порушення відповідних функцій. Якщо мова йде про матеріальну кумуляцію, в цьому випадку порушення функції буде пов'язане безпосередньо з реакцією самої речовини і рецептора. При функціональній кумуляції сама токсична речовина вже відсутня в організмі чи метаболізована, але зміни структури рецептора залишаються.

Виділяють також змішаний тип кумуляції, коли з рецептором взаємодіє не вся молекула отрути, а її фрагменти.

Приклад матеріальної кумуляції – кумуляція сполук важких металів при їх взаємодії з сульфгідрильними групами тканинних білків.

Функціональна кумуляція відбувається, наприклад, при дії прямих метгемоглобіноутворювачів, таких як натрію нітрит.

Взаємодія фосфорорганічних сполук (ФОС) з холінестеразами – приклад кумуляції змішаного типу, оскільки при цьому на ферменті залишається лише частка молекули ФОС – фосфорильна група.

Тип кумуляції характеризує лише якісний бік процесу. В кількісному аспекті перш за все значення має термін, протягом якого діє кумулююча речовина. Ступінь кумулятивних властивостей речовин характеризується часом відновлення вихідної функціональної активності біологічних макромолекул, взаємодія яких з отрутами складає основний механізм токсичного процесу.

Детальне теоретичне вивчення процесу кумуляції є багатоетапним і складним токсикологічним дослідженням, в той час як прикладні дослідження орієнтовані частіше за все на виявлення узагальненого ефекту кумуляції і отримання відповідної інтегральної характеристики кумулятивності речовини шляхом співставлення ізоефективних доз за летальним наслідком або за найбільш чутливими тестами в гострих і підгострих дослідах.

## Методи визначення і оцінки кумуляції лікарських засобів

Токсикологічні дослідження кумуляції мають два основні методичні напрями.

Один з них – вивчення токсикокінетики (фармакокінетики) речовини, тобто вивчення процесів всмоктування, розподілу, перетворювання і виділення. Методичні основи цього напрямку досліджень викладені у відповідних методичних рекомендаціях [8].

Результати вивчення фармакокінетики лікарської речовини необхідно обов'язково брати до уваги, коли здійснюється оцінка кумулятивних властивостей препарату.

Другий напрям оцінки кумулятивних властивостей – вивчення кумулятивності за ефектом, який спостерігають.

Найбільш поширені методи оцінки кумуляції в токсиколого-гігієнічних дослідженнях базуються на визначенні усередненої сумарної кількості отрути (мг/кг), яку отримали тварини в підгострому досліді до появи визначеного ефекту (найчастіше – летального наслідку), і співставлення цієї кількості з одноразовою середньою ефективною дозою  $ED_{50}$  (зокрема –  $LD_{50}$ ). При цьому розраховують коефіцієнт кумуляції  $K_k$ .

Загальноприйнятим у вітчизняній токсикології і фармакології методом оцінки кумулятивних властивостей речовин і препаратів є метод, розроблений Ю.С.Каганом і В.В.Станкевичем (1964).

За цим методом коефіцієнт кумуляції  $K_k$  розраховують як співвідношення  $ED_{50(n)}$  до  $ED_{50}$ , де  $ED_{50(n)}$  – сумарна середньоефективна (летальна) доза в підгострому досліді при введенні речовини  $n$  разів рівними разовими дозами ( $D_p$ ) через рівні проміжки часу – 1 добу. Достатньо протягом 2 місяців випробувати 3 дози, які становлять  $1/5$ ,  $1/10$  і  $1/20$  від  $ED_{50}$ .

Якщо реєструється летальний наслідок, формула буде такою:

$$K_k = \frac{LD_{50(n)}}{LD_{50}}$$

Із зменшенням дози  $D_p$  величина  $K_k$  для різних речовин змінюється по-різному: збільшується (для багатьох ФОС); не змінюється (карбамати); знижується (деякі хлорорганічні сполуки); змінюється двофазно – спочатку знижується, потім збільшується (хлорвуглеводні дієного ряду). При цьому найбільш небезпечними є речовини 3-го типу, найменше – 1-го типу.

При орієнтації тільки на летальний наслідок можна недооцінити небезпечність деяких сполук. Так, деякі ФОС, що містять у молекулі паранітрофенольну групу, при хронічному впливі викликають розвиток анемії та інші зміни, які не пов'язані з основним (антихолінестеразним) механізмом їх токсичної дії.

Крім того, для багатьох лікарських речовин неможливо точно визначити рівень  $LD_{50}$  у зв'язку з їх малою токсичністю. Тому необхідно провести відповідні біохімічні, фізіологічні і морфологічні дослідження, які, при можливості, завершити розрахунком величини  $K_k$ .

Вивчення кумулятивних властивостей фармакологічних субстанцій і лікарських препаратів, для яких неможливо визначити середньосмертельну дозу, відбувається при субхронічних і хронічних випробуваннях з використанням, як правило, умовно терапевтичної дози (мінімальна); дози, яка не менше ніж у 10 разів вища від умовно терапевтичної (можливо – токсична), та проміжної між мінімальною та максимальною. Шлях введення речовини повинен співпадати або бути близьким до реального (рекомендованого для клінічної практики).

Коефіцієнт кумуляції більше 5 вказує на відносно слабо виражену кумулятивну дію речовини, від 3 до 5 – на середній ступінь кумуляції, від 1 до 3 – на виражений ступінь кумуляції, а величина коефіцієнту кумуляції менше 1 свідчить про наявність суперкумулятивних властивостей.

Орієнтовний мінімум інформації можна одержати в гострих дослідях – шляхом визначення індексу кумуляції. Для цього розраховують значення  $LD_{50(1)}$  – за результатами спостереження загибелі тварин у першу добу після введення речовини, а також  $LD_{50(14)}$  – за результатами загибелі тварин за 14 діб спостереження після одноразового введення речовини.

$I_k$  – індекс кумуляції, розраховують за формулою:

$$I_k = 1 - \frac{LD_{50(14)}}{LD_{50(1)}}$$

Вважається, що коли  $LD_{50(1)}$  і  $LD_{50(14)}$  співпадають, тобто  $I_k$  дорівнює 0, – кумуляція не виражена. Чим ближче  $I_k$  до 1 (тобто чим пізніше відбувається загибель тварин), тим більше вірогідність наявності кумулятивних властивостей у речовини.

У гігієнічній практиці іноді  $K_k$  розраховують за результатами тесту «субхронічної токсичності» за схемою Lim et al. у модифікації К.К.Сидорова. Для цього в підгострому досліді тривалістю до 28 днів (24+4) реєструють загибель тварин при введенні речовини зростаючими разовими дозами з інтервалом в 1 добу. В перші 4 доби доза становить  $1/10 LD_{50}$ . Кожні 4 наступні дні дозу збільшують у півтора рази. Коефіцієнт кумуляції розраховують за тією ж формулою, що в методі Кагана-Станкевича. Вважають, що  $K_k \leq 1$  вказує на кумуляцію,  $K_k > 1$  – на підвищення резистентності (tolerance) організму.

---

**Література**

1. Каган Ю.С., Красовский Г.А., Штабский Б.М. Кумулятивные свойства химических соединений, их изучение и оценка//Токсикометрия химических веществ, загрязняющих среду/Под ред. А.А.Каспарова и И.В.Саноцкого.– М.: Центр международных проектов ГКНТ.– 1986.– С. 104–133.
2. Люблина Е.И., Минкина Н.А., Рылова М.Д. Адаптация к промышленным ядам как фаза интоксикации.– Л.: Медицина, 1971.– 208 с.
3. Каган Ю.С., Штабский Б.М. К проблеме молекулярных механизмов кумуляции (о 3-х типах кумулятивного действия токсических веществ)//Гиг. и сан.– 1974.– №11.– С. 69–73.
4. Красовский Г.Н., Шиган С.А., Витвицкая Б.Р., Арсеньева М.В. Метод изучения кумулятивных свойств веществ на основе расчета эффективных доз с использованием функциональных показателей//Применение математических методов для оценки и прогнозирования реальной опасности накопления пестицидов во внешней среде и организме.– К., 1971.– С. 47–52.
5. Саноцкий И.В., Уланова И.П. Критерии вредности в гигиене и токсикологии при оценке опасности химических соединений.– М.: Медицина, 1975.– 328 с.
6. Трахтенберг И.М. Количественные критерии трактовки нормы в связи с оценкой сдвигов и нарушений при воздействии пестицидов//Проблемы гигиены и токсикологии пестицидов.– К.: Здоровья, 1981.– Ч.II.– С. 8–14.
7. Штабский Б.М., Каган Ю.С. К оценке кумулятивных свойств химических веществ по индексу и стандартизованному коэффициенту кумуляции//Гиг. и сан.– 1974.– №3.– С. 65–67.
8. Методичні рекомендації по доклінічному вивченню фармакокінетики лікарських засобів/М.Я.Головенко, І.С.Безверха, В.А.Жила та ін.– К.: МОЗ України, Фармакологічний комітет, 1995.– 27 с.

## ВИВЧЕННЯ ІМУНОТОКСИЧНОЇ ДІЇ ЛІКАРСЬКИХ ЗАСОБІВ

Бутенко Г.М.,  
Терешіна О.П.,  
Максимов Ю.М.,  
Аркадьєв В.Г.,  
Драннік Г.М.,  
Гомоляко І.В.

### Перелік скорочень

**АУК** – антитілоутворюючі клітини  
**ДНК** – дезоксирибонуклеїнова кислота  
**ІЗ** – індекс завершеності фагоцитозу  
**ІЗЛ** – індекс збільшення лімфовузлів  
**ІЗС** – індекс збільшення селезінки  
**ІР** – індекс реакції  
**ІФМ** – імуофлуоресцентний метод  
**Кон А** – конканавалін А – (Т–клітинний мітоген)  
**КМ** – коефіцієнт маси лімфоїдних органів  
**КПЕ** – клітини перитонеального ексудату  
**ЛПС** – ліпополісахарид – (В–клітинний мітоген)  
**НК** – натуральні кілери  
**РБТЛ** – реакція бласттрансформації лімфоцитів  
**РГПТ** – реакція гіперчутливості повільного типу  
**РНК** – рибонуклеїнова кислота  
**РТПХ** – реакція трансплантат проти хазяїна  
**СЕК** – сироватка ембріонів корів  
**СРМ** – кількість імпульсів за 1 хвилину на  $10^6$  клітин  
**УАС** – лінія клітин  
**ФГА** – фітогемаглютинін – (Т–клітинний мітоген)  
**ФІ** – фагоцитарний індекс  
**ФІТЦ** – флуоресцеїн ізотіоціанат  
**ЦТ** – показник цитотоксичності  
**ВА1В/с, СВА, С57ВL** – лінії мишей  
**CD 3, CD 4, CD 8, CD 16, CD 22** – (клональні детермінанти) – клітинні маркери  
**Lg G, Lg M, Lg A** – імуноглобуліни різних класів  
**F<sub>1</sub>** – гібриди першого покоління певних ліній мишей  
**НЕРЕС** – N-2 гідроксипіперазин-N-2-етансульфонова кислота

## Вступ

Імунна система є високочутливою до дії багатьох ксенобіотиків, що може проявлятися у порушеннях маси, клітинності, складу та гістологічної структури лімфоїдних органів: тимусу, кісткового мозку, селезінки, лімфатичних вузлів, периферичної крові. При цьому можуть пошкоджуватися як самі клітини, так і взаємодії між ними, що призводить до порушення імунної функції, підвищення чутливості до інфекційних агентів та появи злоякісних пухлин.

Тому при доклінічному вивченні всіх нових лікарських засобів обов'язковим є тестування на імунотоксичність в наступних випадках:

- усі нові субстанції та всі нові лікарські форми;
- нові лікарські форми, які містять допоміжні речовини, що не дозволені для вживання в медичній практиці і не вивчені раніше на цей вид їх дії; при цьому кожна з речовин досліджується окремо;
- у фіксованих комбінаціях декількох фармакологічних речовин в одній лікарській формі вивчають як комбінацію, так і кожен складову окремо;
- при новому складі лікарської форми, змінах технології її виготовлення або складу допоміжних речовин, випробовують тільки нову комбінацію.

Виключення становлять препарати, що пропонуються для лікування захворювань, які становлять безпосередню загрозу для життя, та засобів для діагностики *in vitro*. Нижче подаються методичні підходи щодо вивчення можливої імунотоксичної дії потенційного лікарського засобу, специфічна дія якого не пов'язана безпосередньо з впливом на імунну систему.

При цьому необхідним є вивчення як неспецифічної ланки імунної реакції, так і двох основних груп реакцій – гуморального та клітинного типу. Для цього рекомендується використовувати такі методи дослідження, які віддзеркалюють інтегральні характеристики діяльності головних ланок імунної системи.

## 1. Загальні положення

### *Тварини*

В експерименті використовують статевозрілих тварин. Значна частка дослідів проводиться на мишах. Пропонуються дві опозитні (щодо імунної відповіді) лінії мишей – С57BL та СВА. Розбіжність по масі тварин в дослідних групах не повинна перевищувати 15%. Якщо препарат пропонується для застосування в педіатричній або геріатричній практиці, то додатково необхідно використовувати тварин відповідного віку, тому що чутливість імунної системи в цих вікових категоріях до імунотоксичної дії має кількісні і якісні відмінності.

У зв'язку з цим при розробці препаратів, що рекомендуються дітям раннього віку, необхідна додаткова консультація з комісією по імуномодуючим лікарським засобам Державного фармакологічного центру.

### *Кількість тварин*

Експериментальні групи складаються не менш, як з 10 тварин обох статей, що дозволяє провести статистичну обробку отриманих результатів. Якщо дія лікарського засобу вивчається в динаміці, то необхідно збільшити кількість тварин у групах для використання їх в різні інтервали експерименту.

### *Шлях введення досліджуваної речовини*

Досліджувана речовина повинна вводиться в організм тварин тим шляхом, який пропонується для клінічного використання. Якщо запропонований шлях введення не можливо відтворити в експерименті, то дослідник має право використати той шлях введення лікарського засобу, який дозволить отримати найбільш виражений вплив досліджуваної речовини на імунну від-

повідь. Необхідно пам'ятати, що чутливість імунної системи людини до дії ксенобіотиків на декілька порядків вища, ніж у тварин. В ряді випадків лікарські засоби можуть вивчатись в системі *in vitro*, особливо в разі аналізу механізмів пошкоджуючої дії на рівні клітин (фагоцитарна активність макрофагів та нейтрофілів, реакція бласттрансформації лімфоцитів).

### ***Рівні доз***

Пропонується проводити дослідження двох рівнів доз досліджуваного препарату.

Мінімальна – адекватна добовій дозі, яка буде використовуватись при клінічних дослідженнях; максимальна – в 5 – 10 разів більша мінімальної дози (яка не виходить за інтервал терапевтичної широти дії лікарського засобу).

У випадку, коли реальна терапевтична доза не встановлена, можна використовувати дози, які послідовно на порядок менші дози  $LD_{50}$  (1/10; 1/100; 1/1000 від  $LD_{50}$ ) при зазначеному шляху введення.

### ***Тривалість введення препарату***

Тривалість введення досліджуваної речовини визначається схемою клінічного застосування препарату, а також терміном оптимальної імунної відповіді. При необхідності, вивчення функціонального стану імунної системи може проводитись через 1–2 міс після закінчення введення препарату з метою визначення довготривалих ефектів та зворотності виявлених порушень. Необхідно мати на увазі, що імунотоксична дія препаратів може проявитись у вигляді зміни опірності до інфекційних агентів (віруси, бактерії, грибки, паразити) або розвитку новоутворень.

### ***План дослідження***

Обов'язковими мають бути наступні експериментальні групи:

1. Інтактні тварини (0);
2. Тварини, яким вводиться препарат (а);
3. Імунізовані тварини (b);
4. Імунізовані тварини, яким вводиться препарат (a+b);
5. Група, якій вводиться розчинник (якщо такий є).

Групи 1 і 2 використовуються для дослідження маси, клітинності лімфоїдних органів, крові, якісного складу лімфоцитів, рівня імуноглобулінів, фагоцитозу, бактерицидної дії сироватки крові, НК-активності, бластної трансформації лімфоцитів на ФГА, Кон А, ЛПС.

Групи 3 і 4 використовуються для оцінки показників гуморального (антитіла, антитілоутворюючі клітини) та клітинного (реакція гіперчутливості повільного типу, реакція трансплантат проти хазяїна тощо) імунітету.

## **2. Оцінка імунотоксичності лікарського засобу**

Для визначення наявності (або відсутності) імунотоксичних властивостей дослідного лікарського засобу необхідно використовувати методи дослідження, які дозволяють отримати мінімум інтегративних характеристик діяльності головних ланок імунної системи:

- 1) В-клітинного імунітету (гуморальна відповідь);
- 2) Т-клітинного імунітету (клітинні реакції);
- 3) факторів неспецифічної резистентності організму.

Головний принцип оцінки дії лікарського засобу на імунну систему полягає в тому, що модулюється нормальна імунна реакція і на тлі її формування, розвитку та реалізації можливо виявити негативний вплив досліджуваної речовини в залежності від її дози та схеми використання.



### *Методи оцінки*

Факторів неспецифічного імунітету:

- фагоцитарна активність макрофагів;
- фагоцитарна активність нейтрофілів;
- НК-активність;
- активність комплементу сироватки.

Дослідження активності факторів, що беруть участь у специфічному імунітеті:

- оцінка впливу препарату на масу та клітинність лімфоїдних органів включно з клітинністю кісткового мозку;
- кількість лімфоцитів та їх популяцій (Т і В лімфоцитів – CD 4, CD 8, CD 3, CD 16, CD 22);
- формула крові;
- бласттрансформація лімфоцитів з ФГА, Кон А, ЛПС;
- рівень Ig G, Ig M, Ig A.

Вивчення впливу на гуморальний імунітет:

- рівень гемаглютининів або гемолізинів до еритроцитів барана;
- кількість антитілоутворюючих клітин в селезінці;
- рівень аглютининів до бактеріального антигену.

Визначення клітинного імунітету:

- реакція гіперчутливості повільного типу;
- реакція трансплантат проти хазяїна.

Морфологічні дослідження.

Наведені вище методи досліджень дають можливість виявити у дослідного лікарського засобу наявність імунотоксичних властивостей та встановити, на яку саме ланку імунної системи він впливає – гуморальний чи клітинний імунітет, або фактори неспецифічної резистентності організму.

Які саме методи досліджень будуть використані при проведенні експериментів, вирішує дослідник. Головна вимога – щоб застосовані методи дозволили дати об'єктивну оцінку дії препарату на імунну систему.

Для цього найбільш доцільно використовувати не один, а два та більше методів, які дозволяють характеризувати стан кожної ланки імунітету.

Це необхідно для отримання достатньої інформації з метою формування загального висновку щодо наявності у дослідного засобу імунотоксичних властивостей.

При виявленні порушень у будь-якій ланці імунної відповіді, в разі, якщо препарат є унікальним за своєю фармакологічною дією і не може бути замінений нешкідливим аналогом, необхідно подальше проведення дослідження з метою виявлення механізмів пошкодження, а саме – продукцію цитокінів, міжклітинні взаємодії, тощо, з метою пошуку засобів зменшення небажаного ефекту.

## **2.1. Фактори неспецифічного імунітету**

### *2.1.1. Фагоцитарна активність макрофагів*

Для оцінки фагоцитарної активності перитонеальних макрофагів отримують клітини перитонеального ексудату. Для цього дослідним мишам в черевну порожнину вводять 5 мл забуференого фізіологічного розчину (рН 7,2–7,4), що містить 20 од/мл гепарину і 1% сироватки ембріонів корів. Протягом 1–2 хв масажують живіт миші, потім роблять розріз передньої стінки і відсмоктують рідину з різних відділів черевної порожнини. Для отримання більшої кількості макрофагів за 48 год в черевну порожнину вводять 1,5 мл 2% розчину пептону і через 48 год відсмоктують рідину [1].

### Метод перший

В отриманому ексудаті підраховують кількість макрофагів, кінцева концентрація яких повинна бути в межах 400–500 тис./мл. Отриману суспензію розливають у пробірки по 1,5 мл. Готують завись агарової культури мікробів (наприклад, стафілококів або іншої культури, придатної для виявлення фагоцитарної активності) в фізіологічному розчині з концентрацією мікробних тіл 500 млн/мл. До кожної пробірки вносять по 0,3 мл зависі мікробів, струшують і ставлять у термостат на 30 хв при 37°С. До дослідних пробірок вносять препарат, що вивчається. Після інкубації роблять мазок на предметному склі, фіксують метанолом 15 хв і забарвлюють за Романовським-Гімза. У світловому мікроскопі підраховують відсоток клітин, які фагоцитують мікроби (фагоцитарний індекс), кількість мікробів, поглинутих одним макрофагом (фагоцитарне число) та фагоцитарну активність, яка визначається шляхом ділення кількості поглинутих мікробів на сто підрахованих клітин.

Наступним етапом досліджень є виявлення перетравлюючої здатності макрофагів. Для цього до залишеної в пробірках суміші додають по 0,05 мл м'ясо-пептонного бульйону (рН=7,3), перемішують і ставлять у термостат (37°С). Проби для мазків беруть через 1 год та 6 год. Перетравлюючу здатність характеризують за індексом завершеності фагоцитозу (ІЗ), який обчислюють за формулою:

$$ІЗ = \frac{\Phi I_1 - \Phi I_6}{\Phi I_1} \cdot 100\% ,$$

де  $\Phi I_1$  та  $\Phi I_6$  – фагоцитарні індекси через 1 та 6 год відповідно. В нормі індекс завершеності фагоцитозу повинен бути  $> 0$ .

Негативна дія дослідного препарату змінить показники  $\Phi I$  і  $ІЗ$  щодо контрольної групи.

### Метод другий

Отриману клітинну суспензію двічі відмивають у середовищі 199. Суспензію клітин доводять до концентрації  $2,5 \cdot 10^6$ /мл, потім 0,2 мл цієї суспензії нашаровують на чисті покривні скельця розміром 11x24 або 18x18 мм, які розташовані у шестилункових планшетах і інкубують 30 хв у зволоженій атмосфері з 5%  $CO_2$  при 37°С. Після інкубації неадгезовані клітини змивають зі скелець теплим розчином середовища 199, послідовно занурюючи їх у три стакани. Клітини, що прилипли до скла, утворюють збагачений макрофагами моношар. Для визначення фагоцитарної активності на отриманий моношар макрофагів наносять 0,2 мл суспензії *E.coli* ( $20 \cdot 10^6$ /мл) у середовищі 199, інкубують 45 хв у зволоженій атмосфері з 5%  $CO_2$  при 37°С. Потім скельця змивають, занурюючи у стакан з теплим фізіологічним розчином, і фіксують 5 хв метиловим спиртом, після чого фарбують за Романовським-Гімза.

У світловому мікроскопі підраховують відсоток клітин, які фагоцитують *E.coli* (фагоцитарний індекс), кількість мікробів, поглинутих одним макрофагом (фагоцитарне число) та фагоцитарну активність, яка визначається шляхом ділення кількості поглинутих мікробів на сто підрахованих клітин [2].

#### *2.1.2 Визначення поглинальної та перетравлюючої здатності нейтрофілів крові*

Досліди проводять на нелінійних мишах або на щурах Вістар. Як тест-мікроб використовують добову агарову культуру *E.coli* (або іншу придатну мікробну культуру) в фізіологічному розчині в концентрації 500 млн мікробних тіл в 1 мл.

До пробірки з ангікоагулянтом (0,2 мл 2% розчину натрію лимоннокислого або 0,2 мл гепарину в концентрації 50 од/мл) вносять 0,1 мл крові, змішують, додають 0,05 мл зависі тест-мікробної культури, витримують у термостаті при 37°С протягом 30 хв. Потім центрифугують при

2000–3000 об./хв до розшарування рідини на верхній (плазма), нижній (еритроцити) та середній (лейкоцити) шари. Пастерівською піпеткою відсмоктують середній шар і роблять 3 – 5 мазків, які фарбують за Романовським-Гімза.

Підраховують 100 клітин нейтрофільних лейкоцитів. При цьому визначають кількість клітин, які поглинули мікробні клітини (фагоцитарний індекс), визначають середню кількість мікробів в одному фагоцитуючому нейтрофілі (фагоцитарне число), а також визначають фагоцитарну активність – середню кількість поглинутих мікробів, поділену на загальну кількість підрахованих нейтрофілів [3].

Для характеристики завершальної (перетравлюючої) функції нейтрофілів можна рекомендувати дослідження активних форм кисню в процесі фагоцитозу. При цьому, про утворення супероксидного радикалу можна судити по відновленню нітросинього тетразолію (НСТ-тест) до нерозчинного формазану. Але слід пам'ятати, що виявлення активних форм кисню не дає повної інформації про процес знешкодження мікробів у фагоциті. Це зумовлено тим, що кілінг мікробів при фагоцитозі здійснюється не тільки киснезалежними, але й киснезалежними механізмами.

### *Реакція з нітросинім тетразолієм*

До першої пробірки з антикоагулянтом вносять 0,1 мл крові. Змішують, додають 0,2 мл середовища 199 і 0,1 мл 0,1% розчину НСТ – спонтанний НСТ-тест. До другої пробірки з антикоагулянтом вносять 0,1 мл крові; 0,1 мл середовища 199; 0,1 мл E.coli, знешкодженої нагріванням (1 млрд/мл) – стимульований НСТ-тест. Витримують у термостаті при 37°C протягом 30 хв, потім додають 0,2 мл 5% формаліну і змішують. Через 30 хв додають 3,0 мл дистильованої води, струшують і через 20 с додають 1,0 мл 3,4% розчину NaCl. Залишають на 10–15 хв при кімнатній температурі. Потім центрифугують при 1500 об./хв. Надосад відсмоктують, роблять мазки з осаду і фарбують за Романовським-Гімза. Підраховують 100–200 клітин нейтрофільних лейкоцитів і визначають відсоток нейтрофілів, які містять в цитоплазмі темні зерна формазану [4].

### *2.1.3. Визначення активності природних кілерів*

Активність природних кілерів визначають за загальноприйнятим методом, розробленим Goodman H.S. [5], за їх здатністю лізувати клітини-мішені, мічені  $\text{Na}^{51}\text{Cr}\text{O}_3$ . В якості клітин-мішеней використовують лінію клітин YAC-1, ріст яких підтримують у середовищі RPMI-1640 з додаванням 10% сироватки ембріонів корів. Клітини мітять, інкубуючи їх протягом 1 год з 100 мкКи  $\text{Na}^{51}\text{Cr}\text{O}_3$ . Активність природних кілерів оцінюють у 18-годинному тесті за вивільненням радіоактивного хрому  $^{51}\text{Cr}$ , а саме: до  $10^4$  мічених клітин-мішеней, які знаходились в 0,1 мл середовища RPMI-1640 із сироваткою ембріонів корів (10%), додають такий же об'єм ефекторних клітин (виділених із селезінки дослідних мишей), так щоб у кінцевому підсумку отримати співвідношення ефекторних клітин до клітин-мішеней 25:1. Усі дослідження проводять у трьох паралелях у мікроплатах (кінцевий об'єм інкубаційної завіси – 0,2 мл). Пластикові мікропанелі інкубують 18 год при 37°C в атмосфері, яка містить 5%  $\text{CO}_2$ . Для оцінки результатів панелі центрифугують 5 хв при 450g і 0,1 мл супернатанту відбирають для підрахунку радіоактивності (CPM – кількість імпульсів за хв/лунку). Спонтанне виділення радіоактивної мітки визначають у контрольних лунках (клітини-мішені без додавання ефекторних клітин), а максимальне вивільнення – інкубуючи клітини-мішені з 0,5% розчином Тритону X-100 (0,1 мл). Відсоток цитотоксичності (ЦТ) підраховують за формулою:

$$\text{ЦТ} = \frac{(\text{CPM в досліді}) - (\text{CPM в контролі})}{(\text{CPM максимальне}) - (\text{CPM в контролі})} \cdot 100\%$$

*2.1.4. Активність комплементу сироватки крові*

Активність комплементу сироватки визначається по 50% гемолізу за загальноприйнятим методом [6, 7].

**2.2. Активність факторів, що беруть участь у специфічному імунітеті**

*2.2.1. Оцінка впливу препарату на масу та клітинність лімфоїдних органів включно з клітинністю кісткового мозку*

Досліди проводять на мишах лінії СВА або білих (нелінійних) мишах масою тіла 18–20 г по 10 тварин в кожній групі. Дослідний препарат вводять протягом 14 діб. Контрольні тварини отримують відповідну кількість розчинника. Лімфоїдні органи (селезінку і тимус) виділяють на 7-й день після завершення введення препарату, зважують і визначають коефіцієнт маси лімфоїдних органів (КМ) за формулою:

$$\text{КМ} = \frac{\text{Маса лімфоїдного органу}}{\text{Маса тіла тварини}} \cdot 100\%$$

Після гомогенізації певної наважки тканини органу в 3% розчині оцтової кислоти вимірюють кількість каріоцитів (млн/1 мг тканини).

Клітини кісткового мозку отримують з кісток стегна мишей. Кістки стегна вилучають стерильно, відокремлюють їх від м'яких тканин, ножицями зрізають епіфізи. Кістковий мозок вимивають шприцем з тонкими голками для внутрішньошкірних ін'єкцій. Клітинну завесь пропускають крізь голки різного діаметру. Підраховують кількість клітин у камері Горяєва, визначають їх концентрацію в залежності та загальний вміст.

*2.2.2. Імунофлуоресцентний метод визначення кількості лімфоцитів та їх популяцій*

Для визначення кількості лімфоцитів та їх популяцій можна використовувати імунофлуоресцентний метод, результати якого можна оцінювати за допомогою мікроскопу (візуально), або проточного цитофлуориметра.

Принцип ІФМ пов'язаний з утворенням специфічного сполучення антитіл з мембранними антигенами живих клітин, які є в суспензії. В прямих методах ІФМ використовують специфічні до клітинних антигенів антитіла, які кон'юговані з флуоресцентною міткою, це є одноступінчаста реакція. В непрямих методах ІФМ використовують спочатку немічені антитіла до клітинних антигенів, а потім мічені флуорохромом антитіла до імуноглобулінів. Таким чином, маркування в непрямих методах проводять у два етапи. Другі антитіла допомагають виявити зв'язані з клітиною перші антитіла. Непрямі методи більш чутливі, ніж прямі. Для того, щоб запобігти кешпінгу та шедингу (злуцування) антигенів після взаємодії з антитілами до суспензії додають 0,2% розчин азиду натрію.

Існує багато різноманітних методів, які дозволяють вилучати лімфоцити з периферичної крові або лімфоїдних органів [1]. Якщо використовують клітини селезінки, то одразу ж після видалення селезінку занурюють до середовища 199, яке містить в собі 10% сироватки ембріонів корів (СЕК). Із селезінки вилучають клітини шляхом розволокнення тканини препаративними голками або шляхом розчавлювання в скляному гомогенізаторі в 3,0 – 5,0 мл середовища 199 з 10% СЕК. Замість середовища можна використовувати фосфатний буфер, який містить в собі від 2 до 4% СЕК або 0,5% альбуміну та 0,01% азиду натрію. Подрібнену у гомогенізаторі тканину переносять у центрифужні пробірки, фільтруючи її через капроновий

фільтр. Відбирають клітини для підрахування та визначення їх життєздатності загально прийнятими методами. Пробірки з клітинами центрифугують 10 хв при 1500 об./хв та температурі + 4°C. Вся наступна робота проводиться при температурі + 4°C. Після центрифугування зливають надосад, і, якщо це необхідно, лізують еритроцити гіпотонічним шоком (4,0 мл дистильованої води і через 20 с 4,0 мл 2-кратного фосфатного буфера). До осаду додають фосфатний буфер, залежно від загальної кількості клітин так, щоб концентрація клітин в 0,1 мл була  $1 \cdot 10^6$  або  $2 \cdot 10^6$ . Отриману суспензію переносять до 96-лункового іланшету у концентрації  $1 \cdot 10^6$  або  $2 \cdot 10^6$  у лунку, центрифугують. Швидкість центрифугування потрібно довести до 1500 об./хв і зупинити ротор. До отриманого осаду клітин додають 50 мкл моноклональних антитіл з визначеною концентрацією. Інкують 30 хв при температурі +4°C, потім додають по 100 мкл буфера, двічі промивають та центрифугують при 1500 об./хв.

Якщо застосовують непрямий метод для визначення поверхневих антигенів лімфоцитів, то після двох промивань необхідно додати 50 мкл розчину, який містить в собі мічені ФІТЦ антитіла до мічених імуноглобулінів мишей або мічений флуорохромом авідин, якщо перші антитіла були кон'юговані з біотином. Інкують 20 хв на холоді, центрифугують, видаляють супернатант, двічі промивають буфером, додають 180 мкл формаліну (2% розчин параформальдегіду на буфері з рН=8) з синім Еванса, який забарвлює ядра клітин, так що вони мають червону флуоресценцію (9 частин 2% розчину параформальдегіду та 1 частина 0,1% розчину синього Еванса). Проби закривають та зберігають у холоді до початку дослідження. Перед дослідженням їх двічі промивають дистильованою водою, центрифугують, осад розчиняють у 20 мкл води та наносять на предметні скельця, підсушують у термостаті та вивчають під люмінесцентним мікроскопом в краплині гліцеролу (60 мл гліцерину, 40 мл 0,375 М NaCl, 0,025 М фосфатного буфера, 0,1% азиду Na, рН=7,6). Визначення Т-лімфоцитів за маркерами клітинної поверхні можна проводити і методами проточної цитометрії [4, 8].

### 2.2.3. Формула крові

Визначення загальної кількості лейкоцитів периферійної крові та лейкоцитарної формули проводять загальноприйнятим методом.

### 2.2.4. Реакція бласттрансформації лімфоцитів (РБТЛ) під впливом Т-клітинних мітогенів (фітогемаглютиніну – ФГА, конканаваліну А – Кон А) та В-клітинного мітогену (ліпополісахариду – ЛПС)

Метод базується на спроможності лімфоцитів під впливом мітогену трансформуватись у бластні клітини.

Для постановки РБТЛ під впливом мітогенів *in vitro* спленоцити у концентрації  $2 \cdot 10^6$ /мл культивують у середовищі RPMI-1640, що містить 10% інактивованої сироватки плодів корів, 10 мМ 2-меркаптоетанолу, 20 мМ HEPES, відповідну кількість ФГА (10 мкг/мл), або Кон-А (5 мкг/мл), або ЛПС (50–100 мкг/мл). Після цього спленоцити інкують 72 год при 37°C. За 4 год до закінчення інкубації до кожної проби вносять по 1 мкКи  $^3\text{H}$ -тимідину. Підготовку проб для виміру рівня радіоактивності проводять за загально прийнятою методикою. Результати подають у вигляді СРМ (кількість імпульсів за 1 хв на  $10^6$  клітин) або індексу стимуляції (відношення кількості імпульсів в досліді до кількості імпульсів у контролі) [9].

Для визначення функціональної активності Т-клітин можна також використовувати РБТЛ у постановці за методом U. Junge et al. [10], за яким реєстрація результатів реакції проводиться візуально під мікроскопом. Для цього клітини інкують, як і у першому випадку. Потім роблять мазки клітин на предметних скельцях, підсушують, фіксують 10 хв метиловим або аб-

солютним етиловим спиртом, фарбують за методом Романовського-Гімза. Під мікроскопом (при збільшенні 7x1, 8x90) визначають відсоток нестимульованих, стимульованих та типових бластних форм лімфоцитів, підраховуючи 200–500 клітин лімфоїдного ряду.

### *2.2.5. Визначення концентрації імуноглобулінів класів Ig G, Ig A, Ig M у сироватці крові (за методом Mancini)*

Концентрацію імуноглобулінів у сироватці крові визначають методом радіальної імунодифузії в гелі. Метод базується на вимірюванні діаметра кільця преципітації, яке утворюється при внесенні дослідної сироватки в лунки. Лунки вирізають в шарі агару, який містить відповідну моноспецифічну антисироватку. Рівень імуноглобулінів визначають за калібрувальною кривою, яка виражає залежність між рівнем імуноглобулінів та діаметром кілець преципітації. Підрахунок проводять за формулою І.І.Жура [11].

## **2.3. Вплив на гуморальний імунітет**

### *2.3.1. Визначення титру гемаглютининів та гемолізинів*

Досліди проводять на нелінійних мишах або мишах ліній СВА, С57BL, BALB/с з масою тіла 18–22 г. Перед початком експерименту тварини проходять карантин (14 дів) і знаходяться на стандартному раціоні харчування.

Імунізацію проводять оптимальною дозою антигену (еритроцити барана відмивають фізіологічним розчином і готують 3% завис) внутрішньоочередово одноразово в об'ємі 0,2 мл/20 г маси.

Дослідний препарат вводять тваринам у двох дозах: добовій умовно терапевтичній та в 5–10 разів більшій, одночасно з імунізацією. Якщо препарат призначений до курсового введення, то його слід вводити дослідним тваринам щоденно протягом періоду імунізації. На 4–7-й день після імунізації у дослідних тварин збирають кров з орбітального синусу, центрифугують (10 хв, 1500 об./хв) і готують сироватку крові.

Визначення титру гемаглютининів. Для того, щоб виключити імунний гемоліз, дослідну сироватку декомплементують шляхом підігрівання 30 хв при 56°C. Потім готують ряд послідовних розведень (1:10, 1:20, 1:40, 1:80 і т.д.) у пластикових панелях в об'ємі 0,2 мл і додають 0,1 мл 1% завису еритроцитів барана та залишають при кімнатній температурі. Оцінку реакції проводять через 2–4 год. При позитивній реакції еритроцити, що аглютинували, вистеляють дно лунки рівномірним шаром. При негативній реакції усі еритроцити збираються разом у вигляді крапки. Результати реакції виражають титром антитіл – величиною, зворотною останньому розведенню сироватки, яка ще аглютинує еритроцити.

Зниження титрів аглютининів у сироватці дослідних тварин в порівнянні з контролем (група тварин, яким замість дослідного препарату вводиться фізіологічний розчин) свідчить про пригнічуючу дію дослідного препарату.

В нормі в середньому  $\log_2$  титру аглютининів у мишей лінії СВА на 7-й день після імунізації оптимальною дозою антигену становить  $9,0 \pm 0,1$ ; у мишей лінії С57BL –  $7,0 \pm 0,2$ ; у нелінійних мишей –  $6,9 \pm 0,2$  [12].

Визначення титру гемолізинів проводиться з використанням основних принципів методу, описаного D.D.McGregor, J.L. Gowans [13].

Сироватку дослідних тварин, як і при визначенні гемаглютининів, декомплементують шляхом нагрівання 30 хв при 56°C. Потім готують ряд послідовних розведень (1:10, 1:20, 1:40, 1:80 і т.д.) у пластикових панелях в об'ємі 0,2 мл, додають 0,1 мл 1% завису еритроцитів барана і 30 хв інкубують при 37°C. До суміші додають комплемент мурчака, який розводять фізіологічним розчином 1:10. Суміш перемішують і інкубують при 37°C 1 год.

Найбільше розведення сироватки, яке спричиняє гемоліз еритроцитів, визначається як титр гемолізинів.

### 2.3.2. Виявлення кількості антитілоутворюючих клітин (АУК) у селезінці (метод Єрне і Нордіна)

Основу методу становить здатність суспензованих в агаровому або агарозному гелі АУК, взятих від імунізованих еритроцитами барана тварин, виділяти в середовище гемолізину, які в присутності комплементу спричиняють лізис розташованих поблизу еритроцитів барана.

Визначають кількість макроскопічних зон гемолізу еритроцитів навколо окремих АУК і підраховують число продуцентів антитіл в розрахунку на певну кількість клітин (наприклад –  $10^6$ ) або цілий орган.

Реакцію проводять на скляних або пластикових чашках Петрі. Імунізацію мишей (нелінійних та лінії СВА, С57ВL) проводять еритроцитами барана внутрішньоочеревинно, одноразово в оптимальній дозі  $2 \cdot 10^8$  в 0,2 мл фізіологічного розчину. Результати реакції оцінюють на 4–5 день після імунізації [14].

Дослідний препарат вводять разом з антигеном за схемами, які позначені в розділі 2.3.1.

### 2.3.3. Визначення аглютининів до бактеріальних антигенів

Тварин імунізують зависсю вбитих мікробів. Титри антитіл визначають за стандартними методиками. Як описано вище, готують ряд послідовних розведень сироватки у об'ємі 0,2–1 мл у пробірках або планшетах і додають 0,2 або 0,5 мл суспензії вбитих нагріванням при  $60^\circ\text{C}$  протягом 45 хв мікробів з мутністю 5 або 6 за шкалою McFarland. Суміш перемішують, пробірки або планшети витримують при температурі  $37^\circ\text{C}$  2 год, потім залишають на ніч у холодильнику. Одночасно ставлять контролю: суспензія мікробів + фізіологічний розчин і сироватка + фізіологічний розчин, в об'ємах, які відповідають основному досліджу. Падіння титру антитіл свідчить про імунотоксичну дію препарату [15].

## 2.4. Визначення клітинного імунітету

### 2.4.1. Реакція гіперчутливості повільного типу (РГПТ)

Ця реакція дозволяє вивчити вплив дослідного препарату на продукцію сенсibilізованими лімфоцитами медіаторів, які супроводжують клітинні реакції повільного типу.

При відтворенні РГПТ білих мишей масою 18–22 г імунізують одноразовим внутрішньоочеревинним введенням еритроцитів барана в дозі  $2 \cdot 10^5$  клітин в об'ємі 0,5 мл фізіологічного розчину натрію хлориду на 20 г маси тіла. Дослідний препарат вводять після сенсibilізації. Через 5 діб експериментальним тваринам в підшву задньої лівої лапи (дослідної) вводять  $10^8$  еритроцитів барана в об'ємі 0,02 мл (завершальна ін'єкція), а в праву (контрольну) лапу вводять ізотонічний розчин натрію хлориду в такому ж об'ємі. Оцінку реакції проводять через 24 год за різницею мас дослідної (Д) і контрольної (К) лап. Для цього обидві лапки відрізають одразу вище п'яточного суглоба після евтаназії тварин. Індекс реакції (ІР) обчислюють для кожної тварини за формулою:

$$IP = \frac{D - K}{K} \cdot 100\%$$

Контрольні групи:

- миші, які отримують тільки еритроцити барана;
- інтактні миші, які не були імунізовані, але отримали завершальну дозу еритроцитарного антигена.

Можлива модифікація методу, яка полягає в тому, що індекс реакції визначають за різницею маси регіонарних лімфатичних вузлів [16].

### *2.4.2. Реакція трансплантат проти хазяїна (РТПХ)*

Ця реакція є корисним методом оцінки імунореактивності лімфоїдних клітин щодо трансплантаційних антигенів *in vivo*. РТПХ спостерігається в тому випадку, коли реципієнту вводять живі гістонесумісні лімфоїдні клітини, які він не може відторгнути.

При оцінці РТПХ за індексом збільшення селезінки реципієнтами клітин використовують гібриди  $F_1$  віком 1–3 доби. Їм вводять внутрішньоочеревинно або внутрішньовенно 0,1 мл середовища Ігла, яке містить  $10^6$ – $10^8$  лімфоцитів однієї з батьківських ліній. Для того, щоб при внутрішньоочеревинному введенні завись не витікала, голку вводять у черевну порожнину через м'язи стегна. Індекс збільшення селезінки визначають через 10 днів. Контрольна група повинна складатися з мишей того ж поносу, яким вводили сингенні клітини (від гібриду  $F_1$ ).

Вимірювання індексу збільшення селезінки. Спочатку у всіх мишей визначають відносну масу селезінки (маса селезінки/маса тіла). Потім знаходять середню арифметичну відносної маси селезінки в контрольній групі і обчислюють індекс збільшення селезінки (ІЗС) у дослідній групі:

$$\text{ІЗС} = \frac{\text{Середня відносна маса селезінки тварини дослідної групи}}{\text{Середня відносна маса селезінки у тварин контрольної групи}}$$

Вважають, що індекси більше 1,3 свідчать про РТПХ. Між величиною індексу збільшення селезінки і логарифмом дози введених клітин існує лінійна залежність, але це справедливо лише в визначеному інтервалі доз, наприклад, при введенні лімфоцитів мишей батьківських ліній гібридам  $F_1$  у дозах від  $0,5 \cdot 10^6$  до  $5 \cdot 10^6$  клітин.

При оцінці РТПХ за збільшенням лімфовузлів як реципієнтів використовують дорослі гібриди  $F_1$ . Їм вводять під шкіру стоп від  $10^6$  до  $2 \cdot 10^7$  лімфоцитів однієї з батьківських ліній. Завись клітин набирають у мікрошприци, вколовши голку між першим і другим пальцями, вводять клітини в обшар під підошвенним апоневрозом посередині стопи. Цим способом можна зробити дві ін'єкції по 20 мкл з інтервалом 15 хв, вводючи  $2 \cdot 10^7$  клітин. У контрлатеральну стопу для контролю вводять сингенні клітини (від гібридів  $F_1$ ). Через 7 днів мишей забивають і беруть підколінні лімфатичні вузли.

Вимірювання індексу збільшення лімфовузлів. Підколінні лімфовузли гомогенізують і визначають кількість клітин з ядром. Оскільки навіть сингенний іпокулят викликає певне збільшення кількості таких клітин, тому в обидві стопи має бути введена однакова кількість лімфоцитів. Кожна миша, таким чином, є дослідною і контрольною одночасно. Індекс збільшення лімфовузлів (ІЗЛ) обчислюють як співвідношення кількості клітин у підколінних вузлах дослідної та контрольної кінцівок:

$$\text{ІЗЛ} = \frac{\text{Кількість клітин після введення напівалогенної зависі}}{\text{Кількість клітин після введення сингенної зависі}}$$

При індексі вище 1,2 щодо контролю різниця вважається вірогідною. При введенні  $10^6$ – $5 \cdot 10^6$  лімфоцитів від мишей гібридам  $F_1$  спостерігають лінійну залежність індексу від логарифму кількості клітин, що вводилися [17].

## **2.5. Морфологічні дослідження**

При вивченні лікарських засобів на імунотоксичність необхідним є контроль можливих морфологічних змін з боку лімфоїдних органів. Для морфологічного вивчення використовують як рутинні гістологічні методи, так і спеціалізовані гістологічні, гістохімічні та імуногіс-



тохімічні методи. Досліджувана речовина повинна вводиться піддослідним тваринам максимальний час відповідно до терміну її застосування. Як морфологічний контроль використовують тварин без імунізації, або на тлі імунізації стандартним антигеном. В останньому випадку за сім діб до закінчення введення дослідної речовини тварин однієї з груп імунізують еритроцитами барана або розчинним антигеном. На 7-й день після імунізації еритроцитами барана у піддослідних тварин і у тварин контрольної групи вилучають лімфоїдні органи (селезінку, тимус, лімфатичні вузли).

Першим етапом є визначення абсолютної та відносної маси лімфоїдних органів. Після цього шматочки дослідних органів фіксують у 10% розчині нейтрального формаліну та рідині Карнуа (для приготування парафінових зрізів) або у 2,5% розчині глутаральдегіду (для занурення у аралдит-епон та подальшого приготування напівтонких та ультратонких зрізів), а також заморожують для подальшого приготування зрізів [18, 19].

Подальшу обробку експериментального матеріалу проводять з використанням рутинних гістологічних методів або спеціальних гістохімічних чи імуногістохімічних методів.

При морфологічному дослідженні увагу звертають на розмір органів, збереженість їх структури, розподіл клітинних популяцій. У разі вивчення структури лімфовузлів імунізованих тварин звертають увагу на кількість та розміри гермінативних центрів, інтенсивність забарвлення Т-залежних ділянок (за Браше).

Для вивчення загальної морфології використовують забарвлення парафінових зрізів гематоксиліном та еозином, а аралдит-епонових напівтонких зрізів толуїдиновим блакитним [19, 21]. Вивчення ультратонких зрізів за допомогою електронної мікроскопії дозволяє виявляти ультраструктурні зміни на субклітинному рівні. Застосовують також гістохімічні методи дослідження лімфоїдних органів. Метод Браше дозволяє виявити ДНК та РНК у лімфобластних та плазматичних клітинах [19]. Гістохімічні методи забарвлення на естерази та фосфатази дають можливість виявляти порушення в розподілі клітинних популяцій (Т-клітинних та В-клітинних зон, макрофагів) [19, 22, 23]. Спеціальні імуноморфологічні методи з використанням моноклональних антитіл дозволяють вивчити розподіл клітинних популяцій у лімфоїдних органах. Найбільш детальний аналіз розподілу клітин в лімфоїдних органах, а також визначення зон накопичення антигенів можна вивчати за допомогою імунофлуоресцентних та імуноферментних методів із застосуванням моноклональних антитіл та мічених антигенів [23].

При імунотоксичній дії фармакологічних препаратів у лімфоїдних органах можуть спостерігатись дегенеративні зміни різних ступенів.

При легкому ступені токсичної дії в лімфоїдних органах з'являються деструктивні зміни лімфоцитів. У корковому шарі лімфовузлів, білій пульпі селезінки виявляються зруйновані лімфоцити. У тимусі спостерігається наявність часточкової структури мозкового шару за рахунок зменшення кількості тимоцитів.

При вираженому токсичному ефекті досліджуваного препарату у тимусі, селезінці та лімфатичних вузлах спостерігається підвищений розпад мононуклеарів. При цьому різко зменшується паренхіма органів. Деякі фолікули та біла пульпа селезінки спустошуються, у корковому шарі тимусу збільшується кількість дегенеративно змінених Т-лімфоцитів.

## Література

1. Лимфоциты. Методы/Под ред. Дж. Клауса; пер. с англ.– М., 1990.– 395 с.
2. Методические рекомендации.– Новосибирск, 1980.– 15 с.
3. Лабинская А.С. Микробиология с техникой исследований.– М., 1982.– 475 с.
4. Шубич М.Т., Медникова И.Т. NBT – тест у детей в норме и при гнойно-бактериальных инфекциях//Лаб. дело.– 1978.– №9.– С. 515–517.
5. Goodman H.S. A general method for quantitation of immune cytotoxicity//Nature.– 1961.– V.190.– P. 269–272.
6. Назаренко Н.А. Количественная реакция связывания комплемента по 50% титру//Лабораторная иммунология/Под ред. проф. О.Е.Вязова.– М., 1967.
7. Зейфарт М. Титрование комплемента//Иммунологические методы/Пер. с немец., под ред. Г.Фримеля.– М., 1979.
8. Лейзерсон У. Методы проточной цитофлуориметрии и сортировки клеток в иммунологии//Иммунологические методы исследования/Под ред. И.Левковитса, Б.Перниса.– М., 1988.– 528 с.
9. Шютт Х. Реакция бласттрансформации лимфоцитов//Иммунологические методы/Под ред. Г.Фримеля.– М., 1987.– 472 с.
10. Junge U., Hoekstra V., Wolfe L., Dienhardt F. Microtechnique for quantitative evaluation of in vitro lymphocyte transformation//Clin. Exp. Immunol.– 1970.– V.7, №3.– P. 431–437.
11. Жура И.И., Охримович Л.М., Михайлишин М.С., Бакалюк О.И. Примененис математического анализа при количественном определении иммуноглобулинов методом радиальной иммунодиффузии//Лаб. дело.– 1985.– №2.– С. 123–124.
12. Мальберг К. Реакция гемагглютинации//Иммунологические методы/Под ред. Г.Фримеля.– М., 1987.– 472 с.
13. McGregor D.D., Gowas J.I. The antibody response of rats depleted of lymphocytes by chronic drainage from the thoracic duct//J. Exp. Med.– 1963.– V.118, №2.– P. 303–320.
14. Jerne N.K., Nordin A.A., Henry C. Cell – bound antibodies.– Wistar Institute Press, 1963.– 109 p.
15. Кэбот Е., Мейер М. Экспериментальная иммунохимия.– М., 1968.– 683 с.
16. Иммунологические методы/Под ред. Г.Фримеля.– М., 1987.– 472 с.
17. Тесенов В. Реакция «трансплантат против хозяина» на мышцах гибридах первого поколения//Иммунологические методы/Под ред. Г.Фримеля.– М., 1979.– С. 182–187.
18. Меркулов Г.А. Курс патологистологической техники.– Л, 1969.– 422 с.
19. Пирс Е. Гистохимия теоретическая и прикладная. Пер. 2 англ. изд.– М., 1962.– 962 с.
20. Sato T., Shamoto M. A simple rapid polychrome stain for epoxy-embedded tissue//Stain. technol.– 1983.– V.48, №5.– P. 22–24.
21. Immunotoxicology and immunopharmacology/Ed. J.H.Dean, M.J.Luster, A.E.Munson HargyAmos.– New York: Raven Press Ltd, 1985.– 551 p.
22. Гайер Г. Электронная гистохимия/Пер. с нем. И.Б.Бухвалова под ред. и с предисловием проф. Н.Т.Райхлина.– М, 1974.– 488 с.
23. Diagnostic Immunopathology. 2nd ed./Eds R.B.Colvin, A.K.Bhan, R.T.McCluskey.– New York, 1995.– 820 p.

## ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНЕ ВИВЧЕННЯ ЕМБРІОТОКСИЧНОЇ ДІЇ ЛІКАРСЬКИХ ЗАСОБІВ

Бишовець Т.Ф.,  
Даниленко В.С.,  
Матвієнко А.В.,  
Степанова Л.В.,  
Баріляк І.Р.,  
Неумержицька Л.В.

### Вступ

В основу методичних рекомендацій покладено провідний нормативний документ – Правила доклінічної оцінки безпечності фармакологічних засобів (GLP), матеріали Наукової групи експертів ВООЗ, що містять рекомендації, викладені в Принципах дослідження лікарських засобів на тератогенність, та матеріали Міжнародної організації по стандартизації (ISO). При складанні даних рекомендацій враховували результати тестування на ембріотоксичність різних хімічних сполук та лікарських засобів в зарубіжних країнах, досвід роботи в даному напрямку провідних інститутів АМН СРСР та академічних інститутів.

Метою досліджень є визначення здатності лікарського засобу спричинити ембріотоксичну дію, що проявляється підвищеним рівнем ембріональної смертності (ембріолетальний ефект) або виникненням вад розвитку та відхиленням від норми в постнатальному періоді (тератогенна дія). Дані рекомендації стосуються впливу лікарських засобів на стадії розвитку після запліднення. Ці стадії охоплюють запліднення яйцеклітини, поділ її, бластоцисту, ембріон, плід та постнатальний розвиток тварин. Термін «виродливість» не обов'язково означає тільки спрямоване ушкодження структури органу чи системи органів. Будь-які порушення росту, маси тіла, виживання, а також відхилення в ембріогенезі слід розцінювати як аномалії розвитку, які можуть бути загальними, локальними, функціональними. Загальні вади розвитку включають відставання в масі тіла, в розвитку, набряки, гематоми різних розмірів. Функціональна суть терміну «вада розвитку» включає в себе параметри поведінки, а біохімічна – метаболічні показники. На думку Всесвітнього альянсу організації з попередження дефектів розвитку, вроджені вади – це будь-які аномалії (функціональні чи структурні), що визначаються у новонародженого або в пізніші терміни життя і викликані як генетичними, так і іншими причинами. Вони включають структурні аномалії, функціональні порушення та розумову відсталість.

Серед значної кількості сполук, що мають ембріотоксичні властивості (хімічні канцерогени, вуглеводні, сполуки сірки, амідни, аміни, важкі метали, хлор- та фторорганічні сполуки), значне місце посідають лікарські засоби: гормональні, снотворні, седативні, транквілізатори, антибіотики та протипухлинні препарати. Тестування ембріотоксичної дії лікарських засобів є одним із заходів профілактики ембріопатій та вроджених аномалій розвитку людини. Тому кожен лікарський засіб, що може бути призначений жінкам в репродуктивному періоді, а також допоміжні речовини, що включені в лікарську форму, перед допуском до клінічних випробу-

вань повинні бути досліджені на таку активність в експерименті на тваринах. Недоцільно, однак, вивчати ембріотоксичну активність тих лікарських засобів, які заздалегідь відомі як можливі тератогени. Така властивість цих препаратів повинна враховуватись у випадку їх вживання при інших захворюваннях.

Досліди повинні включати як вивчення стану плодів під кінець антенатального періоду (1-й етап дослідження), так і стан потомства в постнатальному періоді життя (2-й етап дослідження). Вивчення обмежується першим етапом, якщо лікарський засіб виявляється сильним або дуже сильним тератогеном.

### **1. Вибір об'єкта дослідження**

Вивчати лікарські засоби необхідно на ссавцях. Бажано при виборі тварин враховувати метаболізм препаратів з тим, щоб він був найближчим до метаболізму людини. Для проведення таких дослідів звичайно використовують гризунів (щурів, мишей, хом'яків, кролів). Найбільш придатними для таких цілей є білі щури у зв'язку з раннім настанням у них статевої зрілості, короткого терміну вагітності та простоти визначення її першого дня, високою плодючістю та коротким періодом лактації. Все це важливо, оскільки досліди проводяться на статевозрілих тваринах (Додаток, табл. 1). Крім того, такий вибір є наслідком основного практичного досвіду роботи на щурах по вивченню ембріотоксичних властивостей різних ушкоджуючих факторів навколишнього середовища та доступності цих тварин для більшості лабораторій світу. Суттєвим є також однаковий гемохоріальний тип плаценти у людини та щурів, який забезпечує найбільш тісний контакт між кров'ю матері та плода і вважається найдосконалішим типом плацентації, що виник у процесі еволюційного розвитку тварин. Крім того, ритм розвитку зародка людини в доімплантаційний період наближається до такого у цього виду тварин, що також робить можливим порівняння результатів дослідження в експерименті та клінічних умовах.

Важливо, що у цього виду тварин рідко виникають спонтанні аномалії розвитку плода. Рекомендується уникати використання тих видів тварин, що відомі своєю генетичною нестійкістю, а також спеціально вирощених тварин, вільних від патогенної мікрофлори (гнотобіонтів).

Нові лікарські засоби, що спеціально призначені для лікування жінок під час вагітності, необхідно вивчати на трьох видах тварин – щурах, мишах та кролях і в такій же послідовності. У випадку наявності тератогенних властивостей препарату у щурів, недоцільно додатково досліджувати його на вагітних мишах та кролях. І навпаки, якщо дослідами на щурах не встановлено ембріотоксичний ефект, необхідно додатково дослідити препарат на мишах. При відсутності такої дії і на мишах досліди продовжують на кролях.

Якщо досліджуваний препарат активний як тератоген на одному з зазначених видів тварин, це є досить серйозною пересторогою проти вживання такого препарату при вагітності у жінок, особливо в перший її триместр. У випадку, коли лікарський засіб не призначений спеціально для лікування вагітних жінок та плода, його досліджують на тваринах двох видів.

У дослідях краще використовувати інбредних (лінійних) тварин, що дають найбільш однозначні та стандартні результати. Але, враховуючи гетерогенність людської популяції, на яку екстраполюють дані, отримані в експерименті, широко користуються також неінбредними тваринами.

### **2. Утримання дослідних тварин**

Досліди проводять на абсолютно здорових, інтактних, статевозрілих тваринах (азурах) з масою тіла 180–240 г. Тварини утримуються в оптимальних умовах розплідника (з забезпеченням температурного, світлового режиму, повноцінного харчування, захисту від інфекцій, шуму та інших несприятливих факторів навколишнього середовища). Самок утримують окремо від самців, починаючи з 1,5-місячного віку. Для утримання тварин використовують просторі клітки, кожна з яких повинна мати відповідну позначку, що свідчить про ту чи іншу дослідну групу тварин в залежності від строку вагітності, дози препарату, способу та термінів його введення та ін.

При розміщенні дослідних тварин в одній клітці необхідно пам'ятати про те, що ряд лікарських засобів, які діють на центральну нервову систему, може спричинити підвищення «групової» токсичності.

Вагітні тварини вимагають від експериментатора особливо терплячого та обережного ставлення. Категорично забороняється при роботі з ними користуватись корнцангом. Це не тільки аморально, а й непрактично: поведінка вагітних та лактуючих самок може стати агресивною не тільки по відношенню до експериментатора, а й до новонароджених, що може призвести до підвищеної загибелі потомства, а отже, і до неправильного трактування результатів дослідження.

До 16–17-го дня вагітності щурів можна тримати по декілька голів в одній клітці, а приблизно за тиждень до очікуваних пологів необхідно забезпечити їм індивідуальне утримання. Не можна допускати пологів у загальній клітці. Це може призвести до травмування, загибелі або ж поїдання новонароджених іншими самками.

### 3. Дослідження естрального циклу та визначення датованого строку вагітності

Для формування дослідних груп тварин з точно визначеним першим днем вагітності необхідно вивчити їх естральний цикл. Це також необхідно у випадку спеціальної оцінки впливу лікарських засобів на перебіг естрального циклу та стан статеві системи.

Вивчати естральний цикл тварин необхідно як мінімум за два цикли до включення їх у дослідну групу. Зміна тривалості світлового періоду та темноти протягом доби можуть впливати на перебіг естрального циклу. Тому ідеально для максимального запліднення самки щурів повинні мати 14 годин світлового часу та 10 годин темноти. Травма, стреси, відсутність води, крики та ін. можуть суттєво впливати на перебіг естрального циклу.

Фази естрального циклу (4 стадії залежно від клітинних елементів та їх співвідношення: проеструс, еструс, метаеструс, діеструс) визначають за цитологічною картиною піхвових мазків. Реальне співвідношення епітеліальних клітин, ороговілих клітин та лейкоцитів для 4–5-денного естрального циклу наведено в таблиці 2 Додатка.

Самок щурів (мишей) в стадії циклу, що відповідає пізньому проеструсу або ранньому еструсу, підсаджують до самців у співвідношенні 2:1 або 3 : 1 в кінці робочого дня, а вранці наступного дня досліджують піхвовий мазок (у щурів) або визначають наявність піхвової пробки (у мишей). Мазок беруть кожен раз новим злегка зволеним дистильованою водою ватним тампоном на пристосованому для цього мандрені. Використовують знежирене предметне скло, на яке наносять краплю дистильованої води, а за тим – вміст тампона. Препарат відразу ж досліджують під малим збільшенням мікроскопа, не піддаючи спеціальному забарвленню. Якщо піхвовий мазок містить сперматозоїди, то день їх виявлення вважають першим днем вагітності. Таких тварин маркують, визначають масу тіла, відсаджують в окрему клітку і починають відлік днів вагітності. При цьому зручно користуватись схемою, запропонованою Інститутом експериментальної медицини РАМН (Додаток, таблиця 3).

Перед початком тестування лікарського засобу необхідно на досить значній кількості тварин визначити частоту спонтанної ембріональної смертності та наявність вроджених вад розвитку, що характерні для даної лінії або колонії тварин (так званий «історичний» контроль). Останнє особливо важливо, якщо тестування проводять на нелінійних тваринах, рівень спонтанної смертності та виживає у яких може значно коливатись. Доцільно періодично перевіряти ці контрольні показники, створюючи таким чином «лабораторний» контроль.

### 4. Дози лікарських засобів, що вивчаються

Дозу засобу, що тестується, розраховують на одиницю маси тіла самки. Найдоцільніше, з точки зору подальшої інтерпретації трьох результатів, проводити тестування речовини, викорис-

товуючи три дози: вищу, ефективну-терапевтичну (для даного виду тварин) і проміжну. Як вища використовується максимальна доза, при якій не спостерігається загибелі самок і розвитку видимих ознак інтоксикації при обраній тривалості введення речовини. Цю дозу виявляють експериментально, враховуючи токсикологічну характеристику речовини (ЛД<sub>50</sub>, кумулятивні властивості та ін.). Якщо при одноразовому введенні засіб, що вивчається, не можна ввести в такій дозі (наприклад, при дослідженні готової лікарської форми або малотоксичної сполуки), як вищу використовують дозу, що може бути досягнута при введенні обраним шляхом, максимально для даного виду тварин рідини.

У разі виявлення ембріотоксичного ефекту у вищій або проміжній дозах, при широкому терапевтичному індексі речовини варто визначати порогову дозу за ембріотоксичною дією.

У всіх без винятку ссавців частина зародків гине до і після імплантації, а в деяких зародків спонтанно виникають аномалії розвитку. Тому, в лабораторіях, що проводять тестування, необхідно мати дані щодо так званого «узагальненого» контролю: дані, отримані на інтактних тваринах, що використовувалися як контрольні в попередніх дослідженнях, при збереженні стабільних умов їх утримання.

### **5. Способи введення лікарських засобів**

Існує досить значна кількість способів введення препарату в організм тварин. Але у випадку дослідження лікарського засобу перевагу віддають тому, котрий рекомендується для клінічної практики. Однак, бажано порівнювати результати при одному із способів парентерального (частіше всього внутрішньоочеревинного, внутрішньом'язового) та перорального введення. Домішка лікарського засобу до харчової суміші є небажаною, по-перше, тому, що не дає змоги точно визначити його кількість, що надходить в організм, і, по-друге, може призводити до відмови тварин споживати таку їжу. Тому при пероральному шляху введення використовують металевий шлунковий зонд та відповідний шприц з поділками, що дає змогу точно дозувати досліджуваний препарат у тому вигляді, в якому вивчалась його терапевтична дія. У випадку використання для розчинення препарату спеціальних розчинників або наповнювачів також досліджується їх ембріотоксична дія (негативний контроль).

### **6. Режим введення лікарських засобів**

Введення лікарського засобу протягом всього періоду вагітності тварин може призвести до серйозних змін метаболізму матері, а тому маскувати або індукувати ушкоджуючу дію. Тому такі дослідження повинні доповнюватися іншими, коли препарат вводиться тільки у визначений час вагітності, тобто в ті періоди розвитку плода, які відповідають періодам специфічної чутливості. Для дії ушкоджуючих факторів навколишнього середовища в період органогенезу та плацентарії характерні як аномалії розвитку плода, так і висока ембріональна смертність. Однак найбільш специфічним для доказу безпосередньої дії патогенного фактора на плід слід вважати тератогенний ефект. Це пояснюється тим, що загибель ембріона рідко буває пов'язана з аномаліями розвитку і в основному залежить від змін в материнському організмі або від масивного ураження всієї фетоплацентарної системи. В протигагу цьому вади розвитку ембріона майже завжди залежать від прямої (безпосередньої дії) ушкоджуючого фактора на ембріональні органи та тканини. Тому аномаліям розвитку внутрішньоутробного характеру надається особливе значення в акушерській практиці при визначенні можливої причини, що спричинила тератогенну дію.

У той же час строки введення досліджуваного лікарського засобу повинні охоплювати весь період вагітності тварин, тому що чутливість зародка до сторонніх впливів залежить від стадії його розвитку.

Препарат вводять один раз на добу різним групам тварин: з 1-го по 6-й, з 6-го по 16-й, з 16-го по 19-й (20-й) день вагітності (відповідно 1, 2 та 3 групи). Тваринам першої та третьої

груп вводять препарат в одній дозі (токсичній), другої групи – в трьох дозах. Якщо при введенні препарату в токсичній дозі спостерігається ембріотоксичний ефект, то проводять допоміжні досліді для визначення порогової дози.

## 7. Кількість тварин

Кількість тварин повинна бути значною та достатньою, відповідно до вимог статистичних методів опрацювання експериментальних даних. Висновки про наявність ембріотоксичної дії у фармакологічного препарату неприпустимо робити на невеликій кількості тварин і особливо в окремі періоди вагітності. Розрахунки необхідної кількості піддослідних тварин повинні виходити з того, що для дослідження однієї дози препарату потрібно не менше 20 вагітних тварин в одній групі. Таке ж правило стосується і тих дослідів, в яких вивчаються різні шляхи введення лікарського засобу, а також контрольних груп тварин, які протягом вагітності отримували розчинник або ті домішки, що використовуються для введення субстанції досліджуваного препарату (негативний контроль). В експерименті також повинна бути група тварин інтактного контролю.

## 8. Методи оцінки ембріотоксичної дії та послідовність їх проведення

1. Щоденне спостереження за станом вагітних тварин.
2. Щотижневе зважування вагітних тварин.
3. Знеживлення та розтин тварин.
4. Визначення показників ембріолетальної дії препарату.
5. Вивчення зовнішнього стану плодів для оцінки видимих вад розвитку.
6. Зважування плацент та визначення їх діаметра.
7. Вивчення стану внутрішніх органів плодів за методом Дж. Вільсона в модифікації І.Р.Баріляка.
8. Дослідження тонких порушень в структурі органів плода після фарбування зрізів за П.Петерсом.
9. Вивчення стану кісткової системи плодів за методом Доусона в модифікації А.П.Дибана і співавторів.
10. Дослідження стану кісткової системи плодів після подвійного фарбування на хрящі та кістки за П.Петерсом.
11. Дослідження постнатального розвитку плодів (2-й етап експерименту).
12. Додаткові методи дослідження.
13. Оцінка результатів дослідження.
14. Значимість результатів дослідження.
15. Строки обрахування результатів.

## 9. Значимість результатів дослідження

З теоретичної точки зору, тератогенна активність лікарського засобу може бути оцінена статистичними методами, тобто в залежності від відсотка порушень розвитку в декількох експериментах та дози препарату, при якій спостерігається тератогенна дія. Якщо тератогенний ефект спостерігався лише в одного з трьох видів тварин, ймовірність прояву такого ефекту у людини може бути незначною.

Цінність проведених досліджень на тваринах полягає в тому, що всі відомі препарати, які визначені як тератогени для людини, проявляють таку ж активність і у тварин. Крім того, лікарські засоби, у яких встановлені тератогенні властивості в досліді на тваринах, можуть прояв-

ляти себе як такі у людини лише при відповідних дозах та термінах введення. Однак дози препаратів, що спричиняють тератогенну дію у тварин, відносно вищі. Крім того, реакції ембріону на екзогенні впливи значною мірою залежать від його генетичних властивостей і відрізняються не тільки у різних видів, а й в межах виду від лінії до лінії, навіть між окремими тваринами в межах одного виду. Безпосередні причини видових відмінностей в реакції на тератогенну дію до цього часу невідомі, однак можна гадати, що вони можуть бути пов'язані з різними шляхами метаболізму або утворенням шкідливих метаболітів у деяких, але не у всіх видів тварин.

Отримання ефекту та оцінка ступеня його прояву (вираженості) – питання, що досить взаємопов'язані. Тому, в першу чергу, необхідно визначити, чи є такий ефект наслідком дії препарату, що досліджується.

Як видно з попереднього викладу, оцінка тератогенної дії повинна проводитись на рівні організму (зовнішньовидимі вади розвитку), на рівні органів (вивчення аномалій розвитку внутрішніх органів) та системному рівні (дослідження аномалій розвитку кісткової системи). Однак, крім володіння цими методами, дослідник повинен бути обізнаний з рівнем спонтанного виникнення різних вад та враховувати його при обрахуванні експериментальних даних.

Дослідження багатьох вчених, виконані на досить значному ембріональному матеріалі, свідчать, що такі аномалії розвитку плодів щурів, як фокомелія (та інші аномалії розвитку кінцівок), анофтальмія, вовча паща, мікрогнатія, екзенцефалія та ін. виникають спонтанно з частотою 0,01%. Такі ж вади розвитку характерні при дії сполук з вираженим ембріолетальним ефектом (наприклад, цитостатиків, антиметаболітів та ін.), коли смертність ембріонів може досягати 100%. Крипторхізм, гідроцефалія виникають спонтанно більш ніж у 0,01% плодів, а відставання в розвитку, гематоми, набряки, порушення процесів осифікації та ін. спонтанно виникають у різних груп тварин від 0 до 20% випадків. Показники ж спонтанної ембріональної смертності як до, так і після імплантації знаходяться в межах від 0 до 10–15% випадків.

У даній ситуації різниця між результатами спостережень порушень розвитку плода та показників ембріональної смертності в контрольній та дослідній групах тварин залежатиме від величини, що спостерігається в контрольній групі даної серії дослідження. Тому доцільно використовувати так званий «узагальнений», або «історичний» контроль, що склався в лабораторії дослідної установи в результаті багаторічних досліджень на інтактних тваринах даної лінії (або нелінійних) при стабільних умовах їх утримання.

Відомо, що фактори навколишнього середовища (в тому числі і ксенобіотики) обумовлюють ембріотоксичний ефект, діючи поряд з генетичними факторами. Тому в більшості випадків абсолютна величина показника, що змінюється при ембріотоксичній дії препарату, за інших однакових умов (доза, час або спосіб введення та ін.) прямо залежатиме від спонтанного рівня цього показника у використаних тварин. Якщо зважати на цю ситуацію, то деякі розбіжності в показниках узагальнюючого контролю лабораторій різних установ не можуть суттєво вплинути на однозначність результатів експерименту.

### **10. Строки обрахування результатів дослідження**

Достовірність результатів тестування багато в чому залежить від того, в які строки вагітності досліджували дію лікарського засобу. Наслідки такої дії рекомендується обраховувати у щурів на 20–21-й, у мишей на 19–20-й, у кролів на 26–28-й день вагітності, тобто незадовго до народження плода. У ці строки підраховують показники ембріональної смертності, описують частоту та типи вродливостей, визначають показники тератогенної дії.

Токсична дія лікарського засобу, що вводився тваринам в найбільш пізні строки вагітності, може призвести до загибелі плода під час або незабаром після його народження. Тому у випадку дослідження препарату, що рекомендується для вживання в кінці вагітності жінок або під час пологів, необхідно відібрати декілька груп тварин, яким вводили цей препарат в терапевтичній дозі протягом кількох днів до очікуваних пологів. У цих груп тварин реєструють час та



характер перебігу пологів, кількість мертвих, живих та виродливих новонароджених. Після цього необхідно прослідкувати за виживанням таких плодів протягом двох тижнів.

Необхідно також враховувати, що самки щурів можуть поїдати новонароджених, особливо якщо останні мають ознаки виродливостей, слабкі або народились мертвими. Крім того, слід пам'ятати, що існує також спонтанна загибель новонароджених. Тому, щоб уникнути помилок при проведенні цих досліджень, необхідно мати в розпорядженні однакову кількість тварин у дослідній та контрольній групах.

### 11. Причини помилок при оцінці результатів дослідження

1. Вибір недостатньо здорових тварин.
2. Різниця у вживанні корму дослідними та контрольними тваринами, результатом чого є різний приріст маси тіла у зазначених груп тварин.
3. Неправильний підбір ліній та виду тварин, у яких високий спонтанний рівень виродливостей розвитку, або, навпаки, які стійкі до тератогенної дії лікарського засобу. У таких випадках доцільно користуватись еталонним тератогеном.
4. Не досить правильний підбір доз препарату: або вони досить малі, щоб проявити тератогенну активність, або досить значні, що спричиняють загибель плода, але не тератогенну дію.
5. Неможливість встановити найбільш чутливу до лікарського засобу стадію розвитку тварин, у зв'язку з чим порівняння тератогенної дії досліджуваного засобу і стандартного тератогену є ускладненим.
6. Недостатня кількість тварин, у яких спостерігається затримка деяких показників, що характеризують постнатальний період розвитку.
7. Недостатня вивченість фармакокінетики та фармакодинаміки лікарського засобу.

### 12. Знеживлення та розтин тварин

Самок щурів знеживлюють на 20–21-й день вагітності (мишей – на 19–20-й, кролів – на 26–28-й). Після ланаротомії у тварин виділяють роги матки з яєчниками, переносять їх в чашку Петрі з фізіологічним розчином. За допомогою бінокулярної лупи роблять ретельний огляд яєчників, підраховують кількість жовтих тіл вагітності. Жовті тіла – це виноградоподібні утворення в яєчниках жовтуватого або рожеватого кольору. Число їх повинно бути рівним, або дещо вищим, ніж число місць імплантації. Тварини, що не мають місць імплантації, можуть мати декілька дозріваючих фолікулів у яєчниках, які зовні пагадують жовті тіла, але вони значно менші за розміром та світліші. Тому важливо при підрахунку кількості жовтих тіл вагітності не припуститися помилки, прийнявши фолікули за жовті тіла. Ножицями з тупими кінцями проводять розтин рогів матки по її зовнішньому краю (щоб не пошкодити плоди), видаляють плоди разом з їх плацентами, ретельно оглядають матку та плаценти, реєструють кількість живих, мертвих та резорбованих плодів. Живі плоди реагують на дотик пінцетом, а резорбовані зародки, що загинули на ранніх стадіях розвитку, мають вигляд невеликих (розміром з крапку) темних утворень, симетрично розташованих по зовнішньому краю рогів матки. Якщо загибель зародків відбулася на більш пізніх стадіях розвитку, то резорбції мають вигляд округлих гомогенних тіл діаметром 2,5–3,0 мм.

Результати розтину вагітних тварин заносять до протоколу (Додаток).

### 13. Визначення показників ембріотоксичної дії лікарського засобу

На підставі результатів розтину за нижченаведеними формулами визначають такі показники та заносять їх до таблиць (Додаток, табл. 4, 5).

1. Загальна ембріональна смертність (%) –  $(B - A) : B \cdot 100$ .
2. Загибель ембріонів до імплантації (%) –  $[B - (A+B)] : B \cdot 100$ .
3. Загибель ембріонів після імплантації (%) –  $B : (A+B) \cdot 100$ ,

де : А – кількість живих ембріонів;

Б – кількість мертвих та резорбованих ембріонів;

В – кількість жовтих тіл вагітності.

Показником тератогенної дії препарату є число плодів з аномаліями розвитку, виражене у відсотках до загальної кількості живих плодів.

Ці дані разом з результатами мікроскопічних та мікроанатомічних досліджень стану плодів в залежності від дози препарату представляють у вигляді зведеної таблиці (Додаток, табл. 6).

Далі проводять аналіз ембріотоксичної дії та складають графіки, що характеризують залежність ембріональної смертності від строку вагітності та дози препарату. Перший графік відображає доімплантаційну смертність зародків в залежності від дня вагітності, коли вводився препарат, а другий – після імплантації.

Виконують таку ж постадійну оцінку тератогенної дії препарату, використовуючи дані про види та частоту виродливостей (Додаток, табл. 7). Така оцінка дозволяє виявити найбільш чутливі до впливу препарату періоди пренатального розвитку тварин. Проте необхідно враховувати, що лікарські засоби, які зумовлюють загибель або вади розвитку лише в короткі періоди вагітності (декілька днів), становлять меншу небезпеку порівняно з тими, що здатні викликати таку ж дію протягом довшого періоду, а тому ушкоджувати значну кількість ембріонів. У зв'язку з цим необхідно мати уявлення про вірогідність шкідливої дії препарату протягом всього періоду пренатального розвитку. Для цього вираховують середню величину ембріональної смертності у всіх груп тварин, яким вводили препарат одноразово з 1-го по 17-й день вагітності.

### **14. Зовнішній огляд плодів**

Для оцінки видимих вад розвитку плоди, звільнені від плідних оболонок, переносять в чашку Петрі зі свіжим фізіологічним розчином і вивчають їх за допомогою біокулярної лупи. Тримаючи плід очним пінцетом за зріз пуповини, починають дослідження від черепа, а закінчують хвостом. Огляд черепа дає можливість виявити водянку мозку, мозкову грижу, екзенцефалію, крапіорахіспизис. При огляді органу зору відзначають наявність очей, їх розміри та розташування. Лицьовий череп вивчають на наявність заячої губи та вовчої пащі. Останню можна спостерігати, якщо вставити до рота плода очний пінцет та злегка ним розсунути щелепи. Аномалії зовнішнього вуха можуть спостерігатися у вигляді відхилень у розмірі, формі та положенні, кінцівок – незвичного їх розміру, кількості та розташування пальців. Передня черевна стінка може мати незарощення та пухкову грижу. Аномалії хребта проявляються у відсутності деяких хребців, в результаті чого тіло виглядає коротшим та більш закругленим. Якщо ж спостерігається короткий, загнутий під кутом, або навіть відсутній хвіст, то це є наслідком аномалій розвитку хвостових хребців. Відсутність анального отвору також вважається дефектом розвитку хребта.

Відзначають також відставання у розвитку плодів, що характеризується зниженням їх маси та розмірів, а також наявність гематом різних частин тіла та набряків. Необхідно зауважити, що навіть найретельніший зовнішній огляд плодів за допомогою біокулярної лупи не дає змоги помітити деякі типи аномалій розвитку органа зору, мозку, а тим більше вади розвитку внутрішніх органів та кісткової системи. Тому для більш повного виявлення тератогенних властивостей препарату, що вивчається, необхідно крім макроскопічного дослідження зовнішнього стану плодів дослідити їх мікроанатомічним методом на серії зрізів та методом дослідження кісткової системи. Для цього після зовнішнього огляду та реєстрації всіх виявлених аномалій розвитку загальну кількість плодів розподіляють на дві рівні групи.

Першу піддають фіксації у рідині Буена для подальшого вивчення стану внутрішніх органів, решту плодів фіксують у 96% спирті для дослідження порушень розвитку кісткової системи.

### 15. Дослідження стану внутрішніх органів плода (за методикою Дж. Вільсона в модифікації І.Р.Баріляка)

Дослідження проводять на плодах, які фіксувалися в рідині Буена не менше 1–2 тижнів. Плід закріплюють на пробковому столику і за допомогою безпечного леза розрізом паралельно нижній щелепі відокремлюють голову від тулуба (Додаток, рис. 1).

**Перший розріз** голови проводять перпендикулярно нижній щелепі безпосередньо за вібрисами. На цьому зрізі видно стан нижньої щелепи, переднього відділу твердого піднебіння і носової порожнини.

**Другий розріз** проводиться через середину очних яблук і охоплює шохальні цибулини.

**На третьому розрізі** вивчають стан головного мозку (кори великих півкуль, бокових, третього і четвертого шлуночків). Зріз проводять через великий поперечний діаметр черепа.

**Четвертий розріз** проводять паралельно третьому. Досліджують мозочок і довгастий мозок.

**П'ятий розріз** іде через гортань, стравохід, спинний мозок, судини і слинні залози.

**Шостим розрізом** відсікається шия від тулуба. Розріз проводять перед передніми лапами. Видно стравохід, трахею, спинний мозок, великі судини.

**Сьомий розріз** проходить через органи грудної порожнини безпосередньо за передніми кінцівками. Видно серце, легені, бронхи, стравохід, спинний мозок.

**Восьмий розріз** проводять посередині між сьомим розрізом і пупковим кільцем. Оглядають печінку, а потім обережно виділяють її пінцетом і досліджують стан діафрагми.

**Дев'ятий розріз** проходить нижче пупкового кільця. На цьому розрізі видно печінку, кишечник, підшлункову залозу. Обережно видаливши петлі кишечнику і печінку, можна спостерігати органи тазу: нирки, сечовід, сечовий міхур, пряму кишку, внутрішні статеві органи. Необхідно звернути увагу на нирки (можливість гідронефрозу) і матку з придатками або тестикул з придатками.

Перелік різних видів аномалій розвитку подано у табл. 7 Додатка.

### 16. Дослідження кісткової системи на тотальних препаратах плодів, забарвлених алізарином (за методом Доусона у модифікації А.П.Дибана та співавт., 1970)

Плоди фіксують у 96% етанолі не менше 7 днів. Бажано, щоб кількість спирту перевищувала об'єм фіксованих плодів мінімум у 10 разів. Періодично (не менше 2-х разів) необхідно міняти спирт. Потім плоди, у яких після фіксації в етанолі видалені внутрішні органи, занурюють в 1% розчин гідроксиду калію (КОН) для просвітлення м'яких тканин. Час знаходження плодів в цьому розчині визначають емпірично (1–2 доби). Коли стають помітними закладки кісток, плоди виймають, промивають їх водопровідною водою і переносять в розчин А (150 мл гліцерину, 800 мл дистильованої води і 10 г КОН), до якого додають кілька крапель розчину Б (1% розчин червоного алізарину) до появи світло-фіолетового кольору. Через 3–5 діб окостенілі ділянки скелету забарвлюються в червоно-фіолетовий колір. Для знебарвлення м'яких тканин плоди переносять в розчин А на 7–14 діб. Потім їх потрібно зневоднити шляхом повільного проведення через суміші гліцерину, спирту і води в різних пропорціях (1:2:7, 2:2:6, 4:4:2, рівні частини спирту і гліцерину, а також чистий гліцерин, до якого додають 1–2 краплі формаліну). У чистому гліцерині плоди можуть зберігатися протягом необмеженого часу. Плоди вивчають під мікроскопом моделі МБС. Визначають величину закладок окостеніння, підраховують кількість хребців, ребер, п'ястних та плюсневих кісток.

## **17. Методика фарбування зрізів плодів за П.Петерсом**

Ця методика дає можливість виявити більш тонкі порушення структур, ніж на непофарбованих препаратах. Зрізи, отримані за Вільсоном, промивають протягом 10 хв. у дистильованій воді, щоб видалити з поверхні залишок фіксатора. Потім зрізи занурюють в розчин оцтовокислого крезил віолету на 10 хв. Приготування розчину: оцтовокислий крезил віолет розчиняють у дистильованій воді в 0,1% концентрації. Перед використанням для отримання оптимального фарбування, в основний розчин додають 2% розчин оцтової кислоти до отримання рН = 2,7 (приблизно 1:20). Зрізи в розчині періодично перекладають з однієї сторони на іншу. Зрізи перед дослідженням промивають в дистильованій воді і вивчають під мікроскопом. Після дослідження зрізи можна зберігати в 70% етанолі. При необхідності з пофарбованих зрізів можна приготувати гістологічні препарати. Результати забарвлення: кістка – фіолетова, хрящ – світло-червоний, залозиста тканина – темно-блакитна, інші тканини – жовті, зелені, блакитні.

## **18. Метод дослідження органів плодів за Р.Стейплсом**

Після зовнішнього огляду плодів на наявність зовнішньо помітних аномалій розвитку, визначення маси та краніокаудального розміру, проводять декапітацію і голову фіксують в рідині Бунена для наступного вивчення за методикою Вільсона. Декапітований плід фіксують, очними ножицями розрізають передню черевну стінку і груди (вздовж лівого краю грудини). Пінцетом видаляють вилючкову залозу і досліджують топографію та стан крупних судин, що відходять від серця (права і ліва підключична артерії, загальна сонна артерія, висхідна, низхідна аорта і легенева артерія). Звертають увагу на їх форму та розміри. Пінцетом фіксують серце за вушко правого передсердя, розсікають ножицями серце двома розрізами від верхівки до основи (1 – правіше, 2 – лівіше міжплуночкової перетинки) та досліджують стан міжплуночкової перетинки і клапанів. Потім досліджують стан легенів (кількість часток) та органів черевної порожнини. Після видалення пінцетом печінки визначають стан діафрагми, а видаливши петлі кишечника, обстежують надпиркові залози, нирки, сечоводи, сечовий міхур. Нирки розрізають на рівні ниркових мисок та досліджують їх. Визначають масу (абсолютну та відносну) вилучкової залози, серця, нирок. Установлюють стать плода і вивчають топографію статевих органів. Потім плоди фіксують в 96% етанолі для наступного дослідження в них стану скелета за методом Доусона.

## **19. Подвійне фарбування хрящів та кісток плодів за П.Петерсом**

Після семиденної фіксації плодів, у яких видалено внутрішні органи, в 96% етанолі їх переносять у спиртовий розчин алціанового голубого. Забарвлення плодів досягається через 2–3 дні. Розчин складається з таких компонентів: етиловий спирт 96% – 80 мл, льодяна оцтова кислота – 20 мл, алціановий голубий – 15 мг. Розчин необхідно міняти щоденно. Після забарвлення проводять зневоднення плодів в абсолютному спирті протягом 5 днів (необхідно періодично висвітлювати спирт). Потім плоди переносять в 1% розчин КОН на 3–4 дні, періодично міняючи розчин. Висвітлені плоди забарвлюють 0,001% алізаринном, розчиненим в 1% КОН протягом 2–5 днів. Потім проводять через водні розчини гліцерину шаростаючих концентрацій – 25%, 50% і 80%. Знаходження плодів у кожному розчині – 1 день. Плоди зберігають у чистому гліцерині. Результати забарвлення: кістка – червона, хрящ – блакитний.

## **20. Необхідні реактиви, інструменти та обладнання**

1. Фізіологічний розчин.
2. Етиловий спирт 96% та 70%.
3. Розчин КОН.

4. Льодяна оцтова кислота.
5. Розчин формаліну.
6. Гліцерин.
7. Барвники: червоний алізарин, крезил віолет, алціановий голубий.
8. Рідина Буена (містить пересичений розчин пікринової кислоти, 40% формалін та льодяну оцтову кислоту у співвідношенні 15:5:1 відповідно).
9. Верстат для фіксації тварин (щурів) при внутрішньовенному способі введення препарату.
10. Емальований лоток для проведення розтину тварин.
11. Корковий або восковий столик для виконання зрізів зафіксованих плодів.
12. Ножичі з тупими та гострими кінцями для розтину тварин.
13. Пінцети (анатомічні, хірургічні, очні).
14. Скальпелі.
15. Шлункові металеві зонди різного діаметра.
16. Тонкі гумові зонди.
17. Шприці різного об'єму з набором голок.
18. Посудини з притертими пробками різної ємкості для фіксації ембріонів.
19. Чашки Петрі.
20. Хімічні склянки та колби різного об'єму.
21. Аптечні терези з рівновагами.
22. Вимірювач.
23. Лінійка з поділками.
24. Біноклярна лупа.
25. Окулярометр.

## 21. Допоміжні методи дослідження

Даний етап досліджень проводять лише за необхідності глибшого вивчення ембріотоксичної дії препарату. В цьому випадку число необхідних методів залежить від конкретних завдань, пов'язаних з особливостями дії досліджуваного препарату. Серед таких методів можуть бути рекомендовані наступні:

- Визначення досліджуваної речовини в крові і тканинах внутрішніх органів матері, плода та плаценти з метою виявлення ступеня проникності речовини через плацентарний бар'єр. Показником проникнення лікарського засобу через плаценту є безпосереднє визначення його в плаценті, в цілому ембріоні або в органах та тканинах плода. Конкретний вибір внутрішніх органів для таких досліджень залежить від наявності інформації про органотропність досліджуваного препарату. Вибір методів та підготовки біоматеріалу для досліджень визначається особливостями існуючих методів ідентифікації препарату.

- Структурно-функціональний аналіз печінки, нирок, ендокринних залоз, кори великих півкуль мозку, плаценти та амніотичної оболонки. При цьому морфологічними критеріями ембріотоксичної дії препарату є порушення ступеня клітинно-тканинного диференціювання, поява геморагічних фокусів, деструктивно-дистрофічні процеси в органах-мішенях. Критерієм ранніх змін гомеостазу в організмі антенатального періоду розвитку є зміни активності оксидоредуктаз у тканинах внутрішніх органів плода та в плаценті. Для оцінки функціонального стану плаценти доцільно визначати показники білоксинтетичної активності: вміст РНК, SH-груп, загального білка. Морфометрична оцінка гістологічної будови внутрішніх органів плода та плаценти проводиться відповідно до загальновизнаних методичних підходів при проведенні подібних досліджень.

- Вивчення стану ферментних систем у тканинах та біологічних рідинах материнського організму та плода. Чутливими тестами є визначення активності  $\beta$ -галактозидази, N-ацетил-D-глюкозамінідази, кислої фосфатази, малатдегідрогенази та ацетилестерази, рівня нейрамінової кислоти в тканині головного мозку ембріонів.

- Характеристика білкового обміну в клітинах печінки новонароджених та їх матерів за допомогою гістоавторадіографічного методу. Проводять дослідження з 1-го по 30-й день постнатального періоду, використовуючи мічений по  $^{35}\text{S}$ -метіонін, який вводять за 2 години до знеживлення тварин у дозі, що дорівнює 0,5 мікрокурі на 1 г маси тіла. Кількісний аналіз включення мітки проводять на гістоавтографах при 5-добовій експозиції за допомогою сітки окулярномікрометра та наступним визначенням кількості треків на один квадрат.

- Для характеристики вуглеводного обміну в клітинах печінки новонароджених з 1-го по 30-й день постнатального періоду розвитку та їх матерів проводять цитофотометричне визначення кількості глікогену в клітинах печінки на мікроспектрофотометрі.

- Вивчення синтезу ДНК та мітотичної активності клітин печінки новонароджених тварин (з 1-й по 30-й день) та їх матерів проводять за допомогою гістоавторадіографічного методу. Як індикатор синтезу ДНК використовують  $^3\text{H}$ -тимідин, який вводять внутрішньоочеревинно за 1 годину до знеживлення в дозі 0,5 мікрокурі на 1 г маси тіла. На автографах з  $^3\text{H}$ -тимідином, отриманих через 25–30 днів експозиції, визначають індекс мітки ядер печінкових і купферовських клітин в розрахунку на 2000–4000 досліджених клітин. Крім того, на звичайних препаратах підраховують число мітозів у гепатоцитах (на 4000 клітин) та визначають мітотичний індекс у проміле.

## **22. Вивчення постнатального розвитку плода (2-й етап дослідження)**

Метою досліджень, які проводяться на цьому етапі є:

- виявлення порушень ембріонального розвитку, що проявляються тільки в постнатальному періоді життя;
- уточнення величини порогової дози, встановленої за результатами I етапу досліджень.

Дослідження проводять на віргінних самках лінійних, гібридних або рандомбредних тваринах. Як в підслідній, так і в контрольній групах повинно бути отримано потомство не менш ніж від 15 самок. Досліджувану речовину вводять самкам 1 раз на добу з 1-го дня і до кінця вагітності в ефективній дозі (або в такій, яка перевищує її в кілька разів, з урахуванням терапевтичної дози). Контрольна група самок повинна отримувати у ці ж терміни фізіологічний розчин або інший розчинник, що використовується при введенні препарату. Під час введення лікарського засобу необхідно реєструвати стан і поведінку самок, динаміку маси тіла, тривалість вагітності, перебіг пологів. За 3–4 дні до пологів вагітних самок необхідно розсадити по одній в клітку та забезпечити їх необхідною підстилкою для влаштування гнізда. В кожному приплоді залишають по 8 новонароджених (бажано однаково кількість самців і самок). На 23–25-ий день після народження молодих самців відсаджують від самок.

Одним з основних досліджень, що проводяться при вивченні потомства у постнатальному періоді життя, є вивчення поведінки. Ці дослідження варто починати незабаром після народження, але не раніше, ніж через 24 години, і продовжувати до 2–3 місячного віку. Оцінка поведінки включає такі типи досліджень:

1. Загальне спостереження за фізичним розвитком потомства (Додаток, табл. 8).
2. Вивчення швидкості дозрівання сенсорно-рухових рефлексів у період вигодовування самою (Додаток, табл. 9).
3. Вивчення рухової та емоційної поведінки та здатності до координації рухів у потомства після закінчення вигодовування (Додаток, табл. 10).

4. Вивчення здатності до навчання та пам'яті: формування умовних рефлексів як з позитивним, так і з негативним підкріпленням та збереження отриманих навичок (Я. Буреш та співавт., 1991).

В дослідженнях 1–3 типу повинні бути досліджені всі тварини. При формуванні групи для досліджень 4 типу від кожного приплоду можна взяти групу по 2 тварини. Вибір тестів та їх кількість по кожному типу досліджень здійснюється експериментатором.

Для перевірки чутливості та інформативності використаних тестів доцільно мати дані, отримані з еталонними тератогенами поведінки (наприклад, амфетаміном, метилазоксиметанолом та ін.). Необхідно мати на увазі, що введення деяких речовин під час вагітності може несприятливо впливати на поведінку самок, призводячи до порушення лактації, пригнічення материнських інстинктів та ін. У зв'язку з цим у ряді випадків може виникати необхідність перехресного вигодовування потомства.

У потомстві в постнатальному періоді життя можуть також відзначатися порушення окремих функцій і систем організму: репродуктивної, ендокринної, імунної та функції печінки. Питання про те, вивчення яких органів, систем і функцій необхідно провести, крім вищевказаних досліджень, вирішуються експериментатором, з урахуванням фармакологічних і токсикологічних властивостей досліджуваної речовини, а також результатів першого етапу досліджень.

При статистичній обробці отриманих результатів як незалежну змінну використовують середнє значення відповідного показника для окремого приплоду. У зв'язку з цим при формуванні груп окремих серій досліджень бажано щоб дотримувалось однакоє представництво від кожного приплоду. При цьому необхідно передбачити можливість окремого аналізу результатів для самок і самців. У звіті мають бути представлені відомості про використані методи статистичного аналізу.

### 23. Оформлення протоколу дослідження

На кожну вагітну тварину оформляють картку, нумерують її відповідно до нумерації тварини і вносять до неї такі дані:

- дату настання вагітності;
- результати визначення маси тіла тварини (3–4 досліди, перший раз – протягом доби вагітності, далі – щотижнево, але обов'язково в однакові строки вагітності як в дослідній групі, так і в контрольній);
- назву лікарського засобу, що досліджується, дозу, спосіб та термін його введення;
- дату очікуваних пологів;
- дату реальних пологів;
- тривалість вагітності;
- кількість плодів у приплоді;
- кількість живих та мертвих плодів у приплоді;
- зовнішні аномалії та аномалії кісткової системи мертвонароджених;
- результати візуального дослідження кожного живого плода на предмет виявлення зовнішніх аномалій розвитку;
- краніокаудальний розмір та масу кожного плода (визначається вперше через одну добу після народження, потім щотижнево протягом місяця, а за тим – щомісячно, всього 6–7 дослідів);
- дані про поведінку самки по відношенню до потомства: інстинкт годування та всі випадки його зміни під впливом препарату;
- реєструють всі випадки загибелі плодів у приплоді із зазначенням причин;
- далі вносять будь-які дані, що їх експериментатор вважає за необхідне включити до картки.

Крім картки, до якої вносяться всі дані відносно кожної тварини та її потомства, експериментатор веде протоколи досліджень. Останні можуть бути оформлені загальноновизнаною схемою, але доцільно врахувати наступне. Працюючи з великою кількістю тварин з різним строком вагітності, необхідно згрупувати матеріали таким чином, щоб максимально спростити систему збору інформації при дотриманні всіх необхідних процедур з тваринами. Таким чином відповідає таблиця 3 Додатка. Введення тварині досліджуваного препарату позначається в таблиці довільно вибраним знаком, необхідність зважування або іншої процедури теж можна заздалегідь запланувати. Маючи перед собою таку таблицю, експериментатор точно

знає про те, коли і яким тваринам необхідно ввести препарат, у яких повинні наступити пологи, а яких варто пересадити з загальної клітки в індивідуальну і т.п. Необхідно мати дві такі таблиці – одну для контрольної групи тварин, іншу – для дослідної.

### 24. Пологи. Спостереження за тваринами під час пологів

Тривалість вагітності тварин – дуже важливий показник при вивченні можливої ембріотоксичної дії досліджуваної сполуки. Тому дані щодо тривалості вагітності кожної самки як у випадку з використанням препарату, так і в контролі, повинні бути акуратно занесені до індивідуальної картки. Слабкість родової діяльності, затримка самих пологів можуть бути пов'язані з тією чи іншою патологією плодів.

В експерименті бувають випадки загибелі плодів на пізніх стадіях вагітності, наслідком чого може бути загибель самої самки в результаті генералізованої інтоксикації всього організму. Тому кожну вагітну самку, що загинула до настання природних пологів, розтинають, проводять патолого-анатомічне дослідження і заносять висновок про причину загибелі тварини до її індивідуальної картки.

Якщо ж пройшли всі розумні строки очікуваних пологів, але вони не настали, то тварину знеживлюють, розтинають і піддають вивченню репродуктивні органи (матку, яєчники). Такий аналіз дозволяє встановити причину відсутності потомства у заплідненої самки (загибель зародків на ранніх стадіях розвитку, стерильне спаровування) з необхідністю ретельно дослідити можливий вплив препарату на репродуктивну систему тварин.

Серед дослідних тварин спостерігаються часті випадки стерильних спаровувань, коли при розтині самок не вдається визначити ніяких ознак вагітності. В цьому випадку рекомендується виділити окрему групу самок (не менше 10–15) та піддати їх знеживленню через одну добу після спаровування. Якщо при розтині самок в ампулярній частині яйцеводів будуть знайдені яйцеклітини, що овулювали, необхідно визначити, чи були ці яйцеклітини запліднені. Для цього за допомогою фазово-контрастного мікроскопа вивчають тотальні препарати яйцеклітин після фіксації та пофарбування лакмоїдом або орсеїном. На таких препаратах у незапліднених яйцеклітинах добре видно групу метафазних мейотичних хромосом, а у запліднених – два пронуклеуси.

### 25. Маніпуляції з новонародженими

Новонароджених тварин протягом перших 24 годин постнатального життя брати руками не рекомендується. Всі маніпуляції з ними бажано починати через добу після народження, але спостерігати за ними необхідно безпосередньо з моменту пологів. Перш за все підраховують кількість новонароджених у приплоді. В нормальних природних умовах самка намагається захистити, годувати та зберегти все своє потомство, але бувають випадки, коли самка щурів (мишей) поїдає своїх дітей або просто затоптує їх. Це буває пов'язано з видаленням із приплоду неповноцінних плодів, що народились з ознаками вад розвитку, або просто слабких. Тому статистичні дані про число загинувших протягом першої доби постнатального періоду життя дуже важливі при оцінці ембріотоксичної дії лікарського засобу. Перерахувавши плоди в приплоді, необхідно далі ретельно стежити за їх кількістю та станом.

Перед тим як взяти плід руками, необхідно потерти руки тирсою, яка служить підстилкою тваринам, щоб зменшити чужий для тварин запах. З тієї ж причини не рекомендується перед роботою з тваринами користуватися парфумерією та мити руки милом з ароматизатором.

Необхідно мати на увазі, що введення деяких препаратів під час вагітності шкідливо впливає на організм самки: порушує лактацію, призводить до згасання материнських інстинктів і т.п. У зв'язку з цим в деяких випадках може виникнути необхідність перехресного годування потомства. Але в кожному випадку з самого початку пологів за самкою та її плодами ретельно спостерігають, через 24 години після пологів кожний плід уважно розглядають, від-



значаючи при зовнішньому огляді можливі аномалії розвитку. Результати огляду заносяться до картки самки.

До індивідуальної картки заносяться також такі параметри: розмір приплоду, кількість живих та мертвих новонароджених, число загиблих з тих чи інших причин протягом перших двох тижнів постнатального життя, та далі – до припинення годування. Для кожної групи тварин (дослід та контроль) враховують індекс постнатальної смертності (відносна кількість загиблих, виражена у відсотках).

## 26. Оцінка результатів дослідження

При дослідженні лікарського засобу можуть спостерігатися поодинокі випадки вад розвитку плода або ж значна загибель ембріонів, що не завжди свідчить про ембріотоксичну дію препарату. Тому важливо дати правильну оцінку результатам тестування та визначити, чи є досліджуваний препарат справжнім тератогеном, чи має лише деякі потенційні тератогенні властивості, що проявляються в токсичних дозах та екстремальних умовах, далеких від тих, в яких препарат може використовуватись в клінічних умовах. Для вирішення цього важливого питання необхідно зіставити дози, що викликали вади розвитку або загибель ембріонів в експериментальних умовах, з тими, які передбачається використовувати в клініці (звичайно в перерахунку на масу тіла тварини та людини). Чим ближча межа між тератогенною і терапевтичною та чим більша відстань між тератогенною і токсичною для материнського організму дозами, тим вища вірогідність прояву тератогенних властивостей досліджуваного препарату у людини.

Необхідно визначити такі показники.

1. Індекс ембріолетальної активності (ІЕА), тобто відношення дози, що викликала загибель половини дослідних самок ( $LD_{50}$  для самок), до дози, що викликала загибель половини ембріонів ( $LD_{50}$  для ембріонів). Цей показник виводять на підставі результатів, отриманих при одпоразовій дії препарату в ті дні вагітності, коли ембріони проявляють максимальну чутливість до даного препарату:

$$ІЕА = \frac{LD_{50} \text{ для самок}}{LD_{50} \text{ для ембріонів}}$$

2. Індекс тератогенної активності (ІТА), тобто відношення дози, що викликала загибель половини дослідних самок ( $LD_{50}$  для самок), до дози, що викликала вади розвитку у половини ембріонів ( $TD_{50}$  для ембріонів):

$$ІТА = \frac{LD_{50} \text{ для самок}}{TD_{50} \text{ для ембріонів}}$$

Чим вищі індекси ембріолетальної та тератогенної активності, тим небезпечніший препарат для ембріонів.

3. Нарешті, враховують показники екстенсивності ембріолетальної та тератогенної активності досліджуваного препарату (Додаток, табл. 11).

Для остаточного висновку про те, чи є препарат справжнім тератогеном, чи проявляє такі властивості лише за екстремальних умов (тобто не має суттєвого медичного значення), необхідно зіставити наведені вище показники та проаналізувати умови і результати всіх досліджень. Для правильного висновку необхідно також пам'ятати наступне:

1. Справжні тератогени вражають розвиток всіх або майже всіх зачатків органів, причому характер тератогенної дії змінюється в залежності від стадії ембріогенезу та дози препарату. Тератогенний ефект добре відтворюється при повторних дослідках.

2. Справжні тератогени викликають вади розвитку та загибель ембріонів в дозах, які не спричиняють токсичної дії на материнський організм, тобто індекси ембріолетальної та тератогенної дії завжди значно вищі одиниці. Показник екстенсивної летальної дії справжніх те-

## Доклінічне вивчення нешкідливості лікарських засобів

ратогенів знаходиться в межах 30%, а тератогенної дії – не нижче 4%. У найбільш чутливі до даного препарату періоди вагітності справжні тератогени викликають вади розвитку у 50–90% ембріонів або спричиняють загибель 80–100% ембріонів.

3. Якщо досліджуваний лікарський засіб проявив тератогенні або ембріолетальні властивості лише в токсичних для самок дозах, тобто індекси ембріолетальної та тератогенної дії близькі до одиниці (причому екстенсивність ембріолетальної активності нижча 10%, а екстенсивність тератогенної активності нижча 1%, і вражаються лише окремі зачатки), то ці ознаки свідчать про те, що препарат має незначні потенційні тератогенні та ембріолетальні властивості. Такі дані необхідно враховувати при клінічному вивченні препарату.

При статистичному опрацюванні результатів експерименту за одиницю спостереження приймають приплід, тобто результати, отримані при розтині однієї самки. Матеріали досліджень слід аналізувати різними статистичними методами, використовуючи відповідні критерії статистики в залежності від емпіричного розподілу отриманих даних (критерій  $t$  Стьюдента-Фішера, методи кореляційного, дисперсійного аналізу, непараметричні методи, зокрема критерій Вілкоксона-Манна-Уїтні). Даючи оцінку результатів першого етапу досліджень, використовують нижченаведену схему (А.М.Торчинський і співавт., 1984).

### Схема оцінки вираженості ембріотоксичної дії

Характер порушень	Величина порогової дози	Статистична значимість результату по відношенню до паралельного контролю та його співвідношення з узагальненим контролем
<p>А. Множинні або одиничні аномалії з численним ураженням систем або органів плодів. Спонтанно такі аномалії зустрічаються на рівні, який не перевищує 0,01% (наприклад, евентрація, краніорахізіс, фокомелія, анофтальмія, розчеплення твердого піднебіння та ін.) Ембріолетальність може складати 100%.</p> <p>Б. Множинні або одиничні аномалії з переважним ураженням окремих органів. Рівень спонтанного виникнення перевищує 0,01% (наприклад, гідроцефалія, гідронефроз, крипторхізм, 14 ребро та ін.) Відставання в розвитку плодів (зменшення маси тіла, сповільнення процесу осифікації скелета). Гематоми і набряк підшкірної клітковини. Ембріолетальність.</p>	<p>Т – терапевтична або близька до неї</p> <p>В – вища або близька до неї</p>	<p>1. Статистично значимий, перевищує максимальний рівень "узагальненого" контролю.</p> <p>2. Статистично не значимий, але перевищує максимальний рівень "узагальненого" контролю.</p> <p>3. Статистично значимий, але не перевищує максимальний рівень "узагальненого" контролю.</p> <p>4. Статистично не значимий, не перевищує максимальний рівень "узагальненого" контролю.</p>

### Ступінь вираженості ембріотоксичного ефекту

Дуже сильний	Сильний	Середній	Слабкий	Відсутній
АТ 1	АВ 1 БТ 1	АВ 2 БВ 1	БВ 2	БВ 3 АВ 4 БВ 4

Примітки: 1 – сполучення А3 неможливе при звичайно використовуваній кількості вагітних самок в групі (приблизно 20).

2 – сполучення Т2, Т3 і Т4 не розглядаються, оскільки дослідження починають, використовуючи найвищу дозу препарату і, отже, матимуть місце сполучення В2, В3 і В4.

3 – сполучення А4 неможливе з тієї причини, що і А3, але представлено в схемі для позначення варіанта, при якому в повторних дослідженнях встановлено спонтанний характер появи в дослідних групах поодиноких плодів з аномаліями типу А.

## 27. Основні поняття та терміни

**Ембріотоксичність** – це потенційна можливість сполуки спричинити ушкоджуючу дію на потомство, що проявляється підвищеною ембріональною смертністю на різних стадіях розвитку (ембріолетальна дія), або виникненням вад розвитку та відхилень від норми в постнатальному періоді (тератогенна дія).

**Ембріональний період** – період, що починається від запліднення і триває до початку процесів диференціювання та росту органів (у людини до 9-го тижня внутрішньоутробного розвитку).

**Фетальний, або плідний період** – період становлення та розвитку функцій, що обумовлюють адаптацію організму до умов існування. Зрілий плід набуває здатності диференційовано реагувати на дію факторів зовнішнього середовища, в тому числі і патогенних. Тератогенна дія ушкоджуючих факторів в цей період практично не спостерігається. Виняток становлять аномалії розвитку жіночих статевих органів під впливом лікарських засобів андрогенної дії.

**Фетотоксичність** – ушкоджуюча дія сполуки в фетальний період розвитку.

**Фетометрія** – загальна назва методів визначення розмірів плода або його окремих частин.

**Тератогенність** – виникнення вад розвитку під час вагітності або відхилення в постнатальному періоді у потомства.

**Онтогенез** – процес індивідуального розвитку організму протягом всього життєвого циклу, починаючи з зиготи до смерті.

**Органогенез** – сукупність процесів формування та розвитку органів.

**Пренатальний період** – період ембріонального розвитку, що протікає всередині материнського організму.

**Постнатальний період** – період від моменту народження до смерті.

**Перинатальний період** – період з 28-го тижня внутрішньоутробного розвитку плода (у людини) по 7-й день життя новонародженого.

**Пубертатний період** – період статевого дозрівання.

**Органотропність** – здатність фізичного, хімічного або біологічного фактора вибірково впливати на певний орган.

**Окостеніння** – фізіологічний процес імпрегнації міжклітинної речовини хрящової або сполучної тканини мінеральними солями, переважно солями кальцію.

Інші тератологічні терміни наведені в табл. 7, див. в “Тератологии человека”, 1979.

## Література

1. Абрамченко В.В. Перинатальная фармакология.– СПб.: Logos, 1994.–178 с.
2. Автоматизированные методы обработки экспериментальных и клинических данных с использованием микрокалькуляторов «Электроника БЗ–34» (Методические рекомендации).– К., 1985.– 24 с.
3. Англо-русский глоссарий избранных терминов по практической терминологии. Москва, 1981. Программа ООН по окружающей среде ЮНЕП.
4. Барияк И.Р. Анализ механизмов патогенного действия антидиабетических сульфаниламидов на эмбриональное развитие крыс: Дисс. ...канд. мед. наук.– Л., 1967.– 212 с.
5. Биоскрининг. Лекарственные средства. Перевод монографии А.Thompson: Drug bioscreening, 1990/Под ред. А.В.Стефанова.– К.: Авиценна, 1998.– 250 с.
6. Буреш Я., Бурешова О., Хьюстон Дж. П., Методики и основные эксперименты по изучению мозга и поведения.–М.: Высш. школа, 1991. – 399 с.

7. Гублер Е.В., Генкин А.А. Применение критериев непараметрической статистики в медико-биологических исследованиях.– Л., 1966.– 57 с.
8. Дыбан А.П. Раннее развитие млекопитающих.– Л.: Наука, 1988.– 228 с.
9. Дыбан А.П., Баранов В.С., Акимова И.М.//Арх. анатомии, гистол. и эмбриол.– 1970.– Т.59, №10.– С. 89–100.
10. Западнюк И.П., Западнюк В.И., Захария Е.А. Лабораторные животные, их разведение, содержание и использование в эксперименте.– К.: Гос. мед. изд-во, 1962.– 343 с.
11. Кирющенко А.П. Влияние вредных факторов на плод.– М.: Медицина, 1978.– 216 с.
12. Лакин Г.Ф. Биометрия.– М.: Высш. школа, 1973.– 335 с.
13. Маркова И.В.//Фармакол. и токсикол.– 1990.– Т.53, №4.– С. 82–86.
14. Методические указания по изучению эмбриотоксического действия фармакологических веществ и влияния их на репродуктивную функцию//А.П.Дыбан и др.– М., 1986.– 62 с.
15. Оксенгендлер Г.И. Яды и организм: Проблемы химической опасности.– СПб.: Наука, 1991.– С. 69–106.
16. Принципы оценки риска для потомства в связи с воздействием химических веществ в период беременности: Совместное издание программы ООН по окружающей среде Международной организации труда и Всемирной организации здравоохранения.– М.: Медицина, 1988.– 155 с.
17. Проблема нормы в токсикологии (современные представления и методические подходы, основные параметры и константы)/Под ред. И.М. Трахтенберга.– 2-ое изд.– М.: Медицина, 1991.– 203 с.
18. Русско-украинско-латинский словарь медицинских терминов/Под ред. В.Г. Коляденко, Ю.В.Шапина.– К.: Здоров'я, 1992.
19. Смольникова Н.М. и др.//Фармакол. и токсикол.– 1986.– Т.49, №2.– С. 106–111.
20. Тимченко А.Д. Краткий медико-биологический словарь.– К.: Вища школа, 1988.
21. Тератология человека/Под ред. Г.И.Лазюка.– М.: Медицина, 1979.– 810 с.
22. Торчинский А.И. и др.//Хим.–фарм. журн.– 1984.– №8.– С. 962–966.
23. Торчинский А.М. и др.//Научно-методологические аспекты биологических исследований новых лекарственных препаратов. Матер. Всесоюзн. симпоз. по целенаправленному изысканию физиологически активных веществ (Рига, 7–11 января 1985 г.).– Рига: Зинатне, 1987.– С. 308–317.
24. Тупицька О.М. та ін.//Укр. біохім. журн.– 1997.– Т.69, №2.– С. 35–40.
25. Biological evaluation of medical devices.– Part 3. Test for genotoxicity, carcinogenicity and reproductive toxicity. International Standart. ISO.10993–3: 1992 (E).
26. European Commission of the European Communities. Council Directive of 18 December 1986 on the Laws, regulating the Application of principles of Good Laboratory Practice and the Verification of their Applications for Tests on Chemical Substances (87/18 EEC). The rules Governing Medicinal Products in the Community.–1991.– V.1, Sept.,– P. 145–146.
27. International registry of Chemical currently being tested for toxic effect (CCIEE), June, 1992 (Geneva): UNEP/GLO/WHO, 1992.– 326 p.
28. Principles and methods of toxicology/2nd ed. A.W.Hayes.– New York: Raven Press, 1989.– 929 p.
29. Shepard T.H. Catalog Teratogenic Agents. 4th ed.– Baltimore, 1983.–710 p.
30. Staples R.E. et Haseman I.K.//Selection of appropriate experimental units in teratology. Teratology.– 1974.– V.9, №3.– P. 255–259.
31. Wilson J.G. Teratology principles and Techniques.– 1965.– P. 251–277.

## ДОДАТОК

Таблиця 1

Тривалість основних фізіологічних періодів, що характеризують репродуктивну функцію у деяких гризунів, в днях (P.L.Wright, 1978)

Періоди	щурі	миші	хом'яки	кролі
Настання статевої зрілості	46,0±3,0	28,0	42,0±5,0	120,0–240,0
Тривалість естрального циклу	4,0–5,0	4,0–5,0	4,0	–
Імплантація	5,5–6,0	4,5–5,0	4,5–5,0	7,0
Органогенез	9,0–17,0	7,5–16,0	7,0–16,0	7,0–20,0
Тривалість вагітності	21,0–22,0	20,0–21,0	16,0–17,0	31,0–32,0

Таблиця 2

Співвідношення клітин у піхвових мазках щурів протягом естрального циклу (A.Thompson, 1990)

День циклу	Типи клітин		
	епітеліальні	ороговілі	лейкоцити
чотириденний естральний цикл			
Проеструс	+++	++	±
Еструс	±	+++	–
Метаеструс	++	±	+++
Діеструс	++	+	+++
п'ятиденний естральний цикл			
Проеструс	++	+++	–
Еструс	±	+++	–
Метаеструс	+++	±	+++
Діеструс I	++	+	+++
Діеструс II	+++	++	±

Таблиця 3

Схема реєстрації вагітних тварин (запропонована Інститутом експериментальної медицини РАМН)

№ щура	Дні (числа) поточного місяця																						
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	...
	Дні вагітності (1-й день – запліднення)																						
1	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21		
2		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	
3			1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21
і так далі залежно від кількості вагітних тварин в один день																							
.				1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	.
.				1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	.

## Протокол розтину вагітних щурів

Тема .....

Дата розтину .....

Доза лікарського засобу .....

Спосіб введення лікарського засобу .....

№ тварини (мітка) .....

Маса тіла на момент розтину в г. ....

Кількість живих плодів .....

## Доклінічне вивчення нешкідливості лікарських засобів

Кількість мертвих плодів .....
Кількість резорбованих плодів .....
Кількість жовтих тіл вагітності .....
Маса плодів у г. ....
Краніокаудальний розмір плодів у мм .....
Маса плаценти у г .....
Кількість плодів з видимими аномаліями розвитку .....
Характер аномалій .....

Таблиця 4

### Аналіз ембріотетальної дії лікарського засобу

Група тварин	Контроль	Дослід
Доза мг/кг		
Кількість:		
вагітних самок		
живих плодів (А)		
мертвих плодів (Б)		
місце імплантації (А+Б)		
жовтих тіл вагітності (В)		
загиблих зигот та нерозвинутих яйцеклітин		
Загибель ембріонів:		
до імплантації		
після імплантації		
загальна		
індукована препаратом		

Таблиця 5

### Вивчення ембріотоксичної дії лікарського засобу (назва) на (вказати вид тварин)

Показники	Результати дослідження
Кількість вагітних самок	
Кількість жовтих тіл	
Кількість місць імплантації	
Кількість живих плодів	числ.
Кількість резорбцій	
Передімплантаційна смертність (%)	
Постімплантаційна смертність (%)	
Маса плода (г)	
Краніокаудальний розмір (мм)	
Зовнішній огляд плодів: кількість обстежених плодів, з них з аномаліями розвитку (абс.; %)	
Стан кісткової системи: кількість обстежених плодів, з них з аномаліями розвитку (абс.; %)	
Стан внутрішніх органів: кількість обстежених плодів, з них з аномаліями розвитку (абс.; %)	

## Ембріолетальна та тератогенна активність лікарського засобу \_\_\_\_\_ в дослідках на щурах

Доза \_\_\_\_\_ Спосіб введення \_\_\_\_\_ Обраховання результатів на 20-й (21) день вагітності.

Строк введення (дні) вагітності	Кількість самок	Кількість жовтих тлі	Число місць імплан-тації	Загибель ем-бріонів до імплантації (абс.; %)	Загибель ем-бріонів після імплантації (абс.; %)	Число живих ем-бріонів	Макроскопічне до-слідження, у тому числі аномальних (абс.; %)	Дослідження за Вільсоном, у тому числі аномальних (абс.; %)	Дослідження за Доусоном, у тому числі аномальних (абс.; %)	Середній розмір жи-вих плодів, мм	Середня маса живих плодів, г
1											
2											
3											
4											
.											
17											

## Реєстрація різних видів аномалій розвитку

Лока-лізація аномалій	Вид аномалій	Число ембріонів з даним видом аномалій	
		усього	% від загальної кількості плодів
Головний мозок	аненцефалія мікроцефалія гідроцефалія екзенцефалія		
Спинний мозок	спіна біфіда (spina bifida)		
Орган зору	анофтальмія мікрофтальмія циклопія		
Лицевий череп	заяча губа вовча паща мікрогнатія		
Внутрішні органи	акардія мегаколон гепатомегалія дивертикули гідронефроз крипторхізм неправильне положення органів		
Скелет	акранія гемікранія амелія парамелія синдактилія полідактилія фокомелія редукція зад-ньої частини тулуба		
Хвіст	відсутність укорочення деформація		

Загальні спостереження за фізичним розвитком потомства

Дні спостережень	Реєстровані параметри
1–2	Розмір приплоду, число живих і мертвих новонароджених, число особин різної статі. Вираховується розмір приплоду та індекс загибелі.
4, 7, 14, 21	Загибель новонароджених, маса тіла
з 2	Відлипання вухної раковини (у середньому на 2-й день)
з 4	Поява первинного волосяного покриву (у середньому на 5-й день)
з 6	Прорізування різців (у середньому на 8-й день)
з 12	Відкривання очей (у середньому на 14-й день)
з 23	Опускання сім'яників (у середньому на 25-й день)
з 28	Відкриття вагіни (у середньому на 30-й день)

Таблиця 9

Вивчення швидкості дозрівання сенсорно-рухових рефлексів у плодів у період вигодовування їх самками

Дні спостережень	Показники	Спосіб проведення досліду і параметри, що реєструються
1	2	3
з 2	1. Перевертання на площині*	Тварину кладуть на спину на плоскій поверхні, швидко відпускають і вимірюють час, необхідний для повернення її до нормального положення. Формування рефлексу вважається завершеним (у середньому ~ на 8-й день), якщо щурята повертаються на всі чотири лапи. Дослід проводять не більш ніж по 30 с з кожною твариною до повного формування рефлексу у всіх контрольних приплодах.
з 5	2. Негативний геотаксис*	Дослід проводять 1 раз на день, по 1 хв. Щурята кладуть на похилу поверхню (25°) головою вниз. Рефлекс вважають сформованим, коли щурята повертаються на 180° (у середньому на 7-й день). Можна вимірювати час утримання на похилій площині. Досліди проводять до повного формування рефлексу у всіх контрольних приплодах.
з 6	3. Ухилення обриву*	Щурята кладуть на стіл або підняту над кліткою платформу таким чином, щоб передні лапи торкалися краю столу. Формування рефлексу завершене (у середньому на 9-й день), якщо протягом 10 с щурята відповзають від краю майданчика. Дослід проводять до повного формування рефлексу у всіх контрольних приплодах.
6–8	4. Маятниковий рефлекс	Визначається як зміна напрямку голови і тулуба в горизонтальній площині приблизно 90° за рахунок переміщення передніх лап, коли задні кінцівки підтягнуті і нерухомі. Вимірюється кількість поворотів за 1 хв і кількість змін напрямку на зворотній (реверсія).
8–9 9–11 13–15 17–20	5. Відкрите поле 1	Щурята кладуть на майданчик розміром 30x30 см, на якому проведено лінії, що утворюють 36 квадратів. Реєструють: Піднімання голови і передніх лап. Повзання. Опору на задні кінцівки, підняття всього тіла. Рухову активність (число перейдених квадратів), умивання різного роду, обнюхування, стійки, видряпування по стінці, стрибки, час відсутності активності, можливі аномалії ходи.
з 8	6. Реакція на акустичний стимул*	Тварину садовлять у звукоізолювану клітку. Реакцію тварини на акустичний стимул можна реєструвати автоматично або візуально. Рефлекс вважається сформованим, якщо тварина реагує на акустичний стимул тривалістю 0,3–0,5 с (у середньому формується на 13-й день). Досліди проводять до повного формування рефлексу у всіх контрольних приплодах.



1	2	3
з 14	7. Зіничний рефлекс*	Реєструють скорочення зіниці або поворот голови. Дослід проводять у затемненому приміщенні з точечним джерелом світла до повного формування рефлексу у всіх контрольних приплодів (у середньому 14–15 днів).
14–15	8. Уникнення обриву, викликане візуальним стимулом	Тварину кладуть на майданчик, піднятий на висоту 45 см над поверхнею. Уникнення падіння приймається за позитивну реакцію. Дослід проводять одноразово, після відкривання очей.
10–11	9. Нюхова реакція	Тварину розміщують посередині рейки шириною 6 см з поділками, яку кладуть на клітку. Відстань між клітками можна змінювати. Визначають відстань, на якій тварина правильно вибирає напрямок на клітку з сибсами і матір'ю, в якій вона перебувала перед дослідом. Середній вік формування рефлексу – 10–11 днів. Можна враховувати кількість падінь, ковзань, поєднуючи цей тест з тестом ходіння по смужці.
з 15	10. Мускульна сила *	Тварину кладуть на густу дротяну сітку, повільно повертають на 180°. Вимірюють час знаходження тварини під сіткою. Тварина повинна висіти на сітці не менше 15 с. Досліди проводять до досягнення критерію всіма контрольними приплодами.

Примітка \* – ці показники можна отримати не в динаміці, а одноразово, в очікуваний день дозрівання рефлексу у контрольних тварин.

Таблиця 10

*Дослідження емоційно-рухової поведінки і здатності до тонкої координації рухів*

Дні спостережень	Показники	Спосіб проведення дослідів і реєстровані параметри
з 17-20	Перевертання в повітрі	Тварину тримають спиною вниз на висоті ~ 60 см над м'якою поверхнею і швидко відпускають. Візуально реєструють, чи перевертається тварина у повітрі, щоб упасти на всі 4 лапи.
з 14-25	Утримання на циліндрі, що обертається*	Вивчають час утримання на циліндрі, що обертається (при швидкості 30 об./хв). Досліди проводять по досягненні критерію утримання протягом 3 хв на циліндрі з гумовою поверхнею і діаметром ~20 см. Складність завдання можна варіювати, зменшуючи діаметр циліндра або збільшуючи швидкість його обертання. Порівнюють між собою тварин (в досліді та контролі) одного віку.
з 40-45	Відкрите поле 2	Досліди проводять у 3-хвилинних тестах протягом одного дня при тривалості тесту не менше 3 хв. Щурів розміщують індивідуально у центрі яскраво освітленого майданчика, поділеного на квадрати. Реєструють час виходу з центру майданчика (латентний період), число відвіданих квадратів (рухова активність), число стоячих поз (реакція оглядання), число умивань різного типу (грумінг), число актів дефекації та уренації (емоційність).
з 30-45	Спонтанна рухова активність	Вимірювання рухової активності може бути проведено одним з альтернативних методів аналізу: «більчаче колесо», система з фотоелектричною і магнітною реєстрацією тощо.

Примітка \* – ці показники можна отримати не в динаміці, а одноразово, в очікуваний день дозрівання рефлексу у контрольних тварин.

**Екстенсивність ембріотальної та тератогенної активності лікарського засобу \_\_\_\_\_ в дослідях на щурах**

Доза \_\_\_\_\_ Спосіб введення \_\_\_\_\_

Обрахування результатів на 20-й день вагітності

Умови експерименту	Кількість самок	Кількість жовтих тіл	Кількість імплантацій	Загибель ембріонів до імплантації (абс., %)	Загибель ембріонів після імплантації (абс., %)	Число живих ембріонів, з них	
						нормальних (абс., %)	аномальних (абс., %)
Дослід							
Контроль							

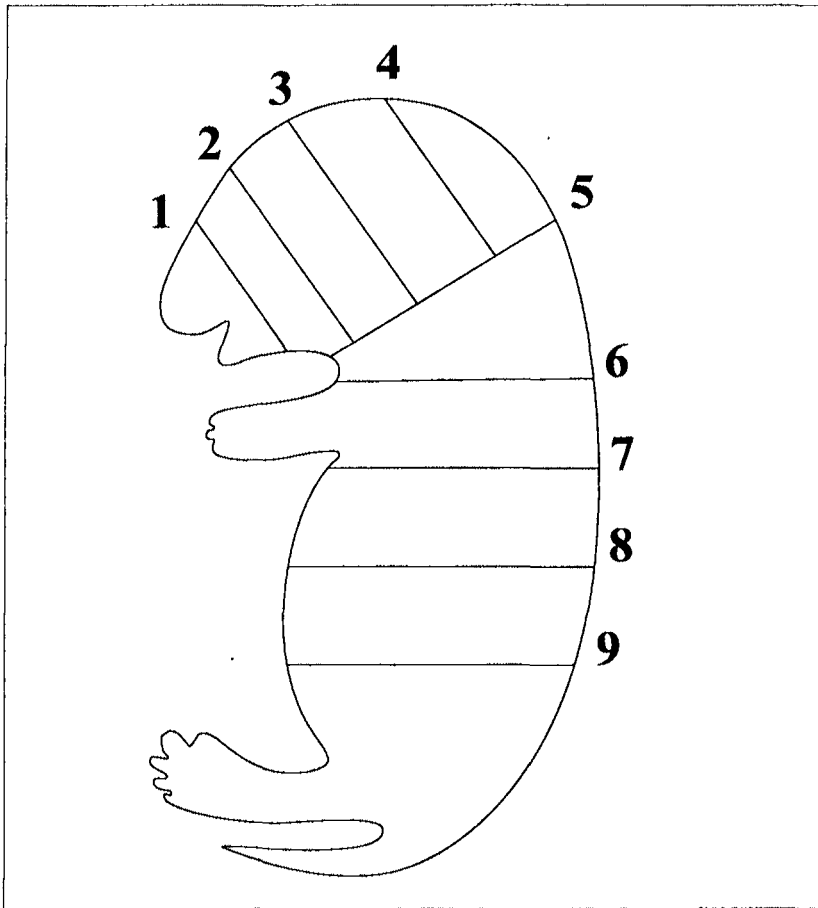


Рис. 1. Схема послідовних розрізів плода щура

## ВИВЧЕННЯ ГОНАДОТОКСИЧНОЇ ДІЇ НОВИХ ЛІКАРСЬКИХ ЗАСОБІВ ТА ЇХ ВПЛИВУ НА РЕПРОДУКТИВНУ ФУНКЦІЮ ТВАРИН

Бариляк І.Р.,  
Неумержицька Л.В.,  
Бишовець Т.Ф.,  
Даниленко В.С.

### Вступ

Забруднення навколишнього середовища хімічними, фізичними і фармакологічними факторами може зумовити розвиток віддалених наслідків. Особливе місце при цьому займають різноманітні порушення репродуктивної функції. Це – ураження статевих залоз, порушення вагітності, послаблення статевої потенції, безпліддя чоловіків та жінок, що призводить до передчасних пологів, викиднів та вроджених вад розвитку.

Аналіз світової і вітчизняної літератури показує, що гонадотоксична дія деяких чинників обумовлена їх мутагенною властивістю, остання, в свою чергу, поєднується з ембріотоксичною дією. Якщо мутації, котрі виникли при цьому, є рецесивними, то по мірі їх накопичення доля спадкових хвороб зростатиме.

Серед значної кількості сполук, що мають гонадотоксичні властивості (хімічні канцерогени, вуглеводні, сполуки сірки, амідни, аміни, важкі метали, хлор- та фторорганічні сполуки), значне місце посідають лікарські препарати: гормональні, снотворні, седативні, транквілізатори, антибіотики та протипухлинні засоби.

Внаслідок відсутності єдиних підходів і методів для проведення експериментальних дослідів в галузі вивчення гонадотоксичної дії лікарських засобів подібні спостереження не включають до програми токсикологічних досліджень, окрім того проводяться вони з використанням неадекватних методів.

В основу методичних рекомендацій покладені провідні документи – Правила доклінічної оцінки безпеки фармакологічних засобів (GLP) та матеріали Міжнародної організації по стандартизації (ISO).

При складанні рекомендацій враховували досвід роботи Українського центру медичної генетики та інших провідних інститутів України та Росії.

Метою дослідження є вивчення гонадотоксичної дії лікарського препарату в експерименті на лабораторних теплокровних тваринах. Наслідки ураження статевих залоз можуть проявитися в порушенні здатності до зачаття, в порушенні внутрішньоутробного розвитку плода (загибель, зупинка розвитку на різних стадіях ембріогенезу, спадкові вродливі та ін.), а також у наступних поколіннях.

Тільки кількісна оцінка лікарських засобів і встановлення рівня ушкоджуючої дії можуть бути одними із заходів профілактики ембріопатій та вроджених аномалій розвитку.

Для оцінки гонадотоксичної дії лікарських засобів використовують патоморфологічні методи та методи, які дозволяють кількісно визначити порушення, що виникли в гонадах піддослідних тварин.

Нижче наведено методи, які дозволяють виявити гонадотоксичну дію лікарських засобів та оцінити їх вплив на генеративну функцію.

### 1. Вибір об'єкта дослідження

Дослідження гонадотоксичної дії фармакологічних засобів проводять в експерименті на статевозрілих тваринах. При виборі виду тварин бажано враховувати метаболізм препаратів з тим, щоб він був найбільш близьким до метаболізму людини. Для проведення таких дослідів звичайно використовують гризунів (щурів, мишей, хом'яків, кролів). Найбільш придатними для таких цілей є білі щурі у зв'язку з раннім настанням у них статевої зрілості, короткого терміну та простоти визначення першого дня вагітності, високою плодовитістю та коротким періодом лактації. Все це важливо, оскільки досліди проводяться на статевозрілих тваринах (табл. 1). Крім того, такий вибір є наслідком основного практичного досвіду роботи на щурах з вивчення гонадотоксичних властивостей різних ушкоджуючих факторів навколишнього середовища та доступнос-

**Таблиця 1**  
**Тривалість основних фізіологічних періодів, що характеризують репродуктивну функцію у деяких гризунів, в днях (P.L.Wright, 1978)**

Періоди	щурі	миші	хом'яки	кролі
Настання статевої зрілості	46,0±3,0	28,0	42,0 ± 5,0	120,0–240,0
Тривалість естрального циклу	4,0–5,0	4,0–5,0	4,0	–
Імплантація	5,5–6,0	4,5–5,0	4,5–5,0	7,0
Органогенез	9,0–17,0	7,5–16,0	7,0–16,0	7,0–20,0
Тривалість вагітності	21,0–22,0	20,0–21,0	16,0–17,0	31,0–32,0

ті цих тварин для більшості лабораторій світу. Важливо, що у цього виду тварин рідко виникають спонтанні аномалії розвитку плода. Рекомендується уникати використання тих видів тварин, які відомі своєю генетичною нестійкістю, а також

спеціально вирощених тварин, вільних від патогенної мікрофлори (гнотобіонтів).

У дослідах краще використовувати інбредних (лінійних) тварин, що дають найбільш однозначні та стандартні результати. Але, враховуючи гетерогенність людської популяції, на яку екстраполюють дані, отримані в експерименті, широко користуються також неінбредними тваринами.

### 2. Утримання дослідних тварин

Досліди проводять на абсолютно здорових, інтактних, статевозрілих тваринах масою 180–240 г. Тварини утримуються в оптимальних умовах розплідника (з забезпеченням температурного, світлового режиму, повноцінного харчування, захисту від інфекцій, шуму та інших перешкод навколишнього середовища). Для утримання тварин використовують просторі клітки, кожна з яких повинна мати відповідну позначку, що свідчить про ту чи іншу дослідну групу тварин в залежності від строку вагітності, дози препарату, способу та термінів його введення та ін.

При розміщенні дослідних тварин в одній клітці необхідно пам'ятати про те, що ряд лікарських засобів, які діють на центральну нервову систему, можуть спричинити підвищення «групової» токсичності.

Вагітні тварини вимагають від експериментатора особливо терпеливого та обережного ставлення. Категорично забороняється при роботі з ними користуватись корнцангом. Це не тільки аморально, а й непрактично: поведінка вагітних та лактуючих самиць може стати агресивною не тільки щодо експериментатора, а й до новонароджених, що може привести до підвищеної загибелі потомства, а, отже, і до неправильного трактування результатів дослідження.

До 16–17-го дня вагітності щурів можна тримати по декілька голів в одній клітці, а приблизно за тиждень до очікуваних пологів необхідно забезпечити їм індивідуальне утримання. Не

можна допускати пологів у загальній клітці. Це може призвести до травмування, загибелі або ж поїдання новонароджених іншими самицями.

### 3. Вивчення стану сперматогенезу та функціонального стану сперматозоїдів

Дослідження гонадотоксичної дії хімічних сполук проводять в експерименті на статевозрілих білих щурах-самцях масою 180–200 г. У групу рекомендується включати не менше 10 тварин. Дослідження проводять у тварин, забитих шляхом дислокації шийних хребців через 24 години після одноразової 4-годинної експозиції.

#### 3.1. Макроскопічне дослідження сім'яників

Макроскопічне дослідження сім'яників включас:

- а) зовнішній огляд з метою виявлення патологічних відхилень (кровонаповнення, запальні зміни, атрофія та інше);
- б) зважування обох сім'яників і розрахунок відношення маси сім'яників до маси тіла;
- в) визначення розмірів сім'яників (довжина, об'єм).

#### 3.2. Мікроскопічне дослідження сім'яників. Морфологічні показники стану сперматогенного епітелію

Незважаючи на те, що виразні ушкодження сперматогенезу спостерігаються вже при макроскопічному дослідженні (зміна маси та розміру сім'яника), перш за все, важливими є показники, які характеризують початкові зміни, здатні виникати при мінімальних граничних рівнях хімічного впливу.

Сім'яники фіксують у 10% нейтральному формаліні або в рідині Карнуа, заливають у парафін, ріжуть тонкі зрізи (6–7 мкм), фарбують гематоксилін-еозином.

Морфологічну оцінку стану сім'яродного епітелію проводять за такими кількісними показниками:

- а) індекс сперматогенезу підраховують за 4-бальною системою: фіксують у каналці наявність сперматогоній, сперматоцитів I або II порядку (швидка зміна фаз), сперматид і сперматозоїдів, потім вираховують індекс сперматогенезу  $\Sigma A/100$ , де А – число стадій у кожному каналці, 100 – число врахованих каналців;
- б) сумарна кількість нормальних сперматогоній (перший на базальній мембрані шар клітин) і число дегенеративних форм сперматогоній (підраховують у 20 круглих каналцях);
- в) кількість каналців зі злущеним сім'яродним епітелієм підраховують при перегляді 100 каналців;
- г) відносна кількість каналців у метафазі II поділу дозрівання (підраховують у 100 каналцях).

Одночасно визначають якісні зміни: відшарування епітелію від базальної мембрани, дегенеративні явища («вікна») в сім'яродному епітелії, наявність гігантських клітин та ін.

Для прискореної оцінки вираженості гонадотоксичної дії хімічної сполуки можливе використання двох показників порушення сперматогенезу - сумарна кількість нормальних сперматогоній і кількість каналців зі злущеним сім'яродним епітелієм.

У хронічних дослідках на завершальному етапі з метою повного аналізу дії речовини проводять дослідження за всіма вищевказаними показниками. Форма обліку стану наведена в таблиці 2.

Таблиця 2

#### Стан сперматогенезу

Доза речовини	Тривалість введення	Кількість на 100 каналців			
		сперматогоніїв	сперматоцитів I і II-го порядків	сперматид	сперматозоїдів

**3.3. Визначення кількості нуклеїнових кислот в сім'яниках  
(біохімічні та гістохімічні методи)**

Біохімічні та гістохімічні методи визначення нуклеїнових кислот в сім'яниках можуть бути використані для раннього виявлення гонадотоксичної дії досліджуваних речовин:

а) біохімічне визначення ДНК та РНК проводять у гомогенаті сім'яника за методом Р. Цапєва та Г. Маркова (1963) ;

б) дослідження розподілу ДНК та РНК в різних генераціях сперматогенного епітелію.

Для виявлення РНК застосовують метод Браше – фарбування метиловим зеленим – піраніном, що ґрунтується на одночасному фарбуванні двох зрізів. При цьому один із зрізів повинен бути попередньо оброблений рибонуклеазою. Матеріал, що забарвлюється в червоний колір піраніном і зникає при обробці рибонуклеазою, є РНК.

Для виявлення ДНК використовують реакцію Фельгена, в основі якої лежить кислотний гідроліз фіксованої тканини, з наступним фарбуванням реактивом Шиффа.

**3.4. Функціональний стан сперматозоїдів  
(фізіологічні методи)**

Для виявлення характеру і тривалості руху сперматозоїдів придатки щура витягають, подрібнюють ножицями і вивчають за методикою Є.К.Міловаєова (1962) в модифікації Г.І.Єгорової (1966). Використовують суспензію сперматозоїдів, отриману при поздовжньому розрізі придатка сім'яника щура і дозованому (2 хвилини) перемішуванні його в фізіологічному розчині (2 мл) на годинниковому склі відрізком трубки (але не скляною паличкою). Температура розчину 22–28°C. Для спостереження за тривалістю руху сперматозоїдів крапля суспензії наноситься на предметне скло з лунками, яке вміщують до вологої камери (чашка Петрі, закрита звичайним склом). Останню ставлять на столик, який обігрівається, при температурі 24°C та зазначають час повного припинення руху сперматозоїдів.

Для визначення відносної кількості живих сперматозоїдів на предметне скло наносять 1 краплю суспензії і 1 краплю 0,5% водного розчину еозину, після змішування впродовж 1–2 с готують мазок, який негайно мікроскопують, підрахунок проводять на 200 сперматозоїдах. Фарбуються тільки мертві сперматозоїди.

Для підрахунку відносної кількості патологічних форм (деформація, подвосення, набухання чи зморщування як головки, так і шийного та хвостового відрізків сперматозоїдів, та інше) готують мазки: одну краплю суспензії наносять на предметне скло, підсушують на повітрі і фарбують барвником – лужним розчином метилового фіолетового. Підрахунок проводять на 200 сперматозоїдах.

При вивченні кислотної резистентності до суспензії сперматозоїдів поступово додають 0,1н розчин соляної кислоти, одночасно визначаючи рН середовища і рухливість сперматозоїдів. Значення рН в момент припинення руху сперматозоїдів свідчить про їх максимальну кислотну резистентність. Реєстрацію рН здійснюють на рН-метрі.

Осмотичну резистентність досліджують при додаванні до суспензії сперматозоїдів розчинів натрію хлориду різної концентрації (2,8 – 5,6%). Фіксують мінімальну концентрацію натрію хлориду, яка викликає припинення руху сперматозоїдів.

Концентрацію сперматозоїдів визначають шляхом набору суспензії в меланжер для лейкоцитів і підрахунку у 5 великих квадратах по діагоналі в камері Горяєва. Можливе використання целоскопа 202.

Стан окисно-відновних процесів в сперматозоїдах можна визначати за методом Варбурга, потенціометрією або за методом Н.П.Шергіна (1961), в основі якого реакція з 0,01% р-ном метиленового синього. Швидкість знебарвлення метиленового синього пропорційна кількості сперматозоїдів та інтенсивності їх дихання.

Для цього на предметне скло наносять дві краплі розчину метиленового синього та дві краплі суспензії, змішують і всмоктують у скляну трубку діаметром 0,8–1 мм і довжиною 2 см. Трубки кладуть на білий папір і зазначають час знебарвлення середини стовпчика (кінці залишаються блакитними).

З метою дослідження функціонального стану сперматозоїдів за допомогою біохімічних методів пропонується не використовувати метод визначення вмісту гіалуронідази в сперматозоїдах (ферменту, для якого властиво роз'єднувати клітини променистого вінця яйцевої клітини без їх деструкції і, таким чином, робити можливим проникнення сперматозоїдів). Звичайно використовують віскозиметричний або турбометричний методи.

#### **4. Методи оцінки функціонального стану яєчників у експериментальних тварин**

Дослідження функціонального стану яєчників при дії хімічних сполук проводяться в експерименті на самках білих щурів масою 180–200 г. Переважне використання білих щурів зумовлено тим, що у них є короткочасний, добре вивчений статевий цикл. Щурі відносяться до спонтанно овулюючих тварин, забезпечують можливість швидко отримати масовий матеріал.

Для оцінки можливості ураження функції та мікроструктури яєчників лабораторних тварин проводять дослідження хімічних сполук на рівнях порога хронічної дії (за показниками загального токсичного ефекту) з встановленням порога специфічної дії.

В експеримент відбираються тільки ті тварини, які мають нормальний естральний цикл. Встановлення характеру естрального циклу проводиться до досліду приблизно протягом двох тижнів і є обов'язковим.

При вивченні функціонального стану яєчників застосовують такі методи:

1. Дослідження естрального циклу.
2. Визначення відносної маси яєчників і кількісна оцінка їх мікроструктури.
3. Визначення гонадотропної функції гіпофіза.

##### **4.1. Дослідження естрального циклу**

Естральний цикл у тварин вивчається шляхом аналізу вагінальних мазків, які обережно беруться з допомогою змоченого у фізіологічному розчині ватного тампона, приготованого на тонкій скляній паличці або сірнику (можна використовувати для цієї мети очні піпетки). Мазки наносяться в краплю фізіологічного розчину на предметне скло. Їх можна розшифрувати в живій краплі без попереднього забарвлення, але зручніше проводити аналіз кольоцитограм після забарвлення будь-яким способом: гематоксилін-еозином або 1%-им водно-спиртовим розчином метиленового синього.

Визначення стадії естрального циклу проводиться за співвідношенням елементів у вагінальному мазку (табл. 3).

Враховують тривалість естрального циклу, його окремих фаз, а також ритмічність чергування фаз циклу.

Тривалість естрального циклу у білих щурів в нормі коливається від 4 до 6 днів; фази еструсу – до 1 дня; дієструсу – до 2 днів; метаеструсу – 6 годин.

Вагінальні мазки досліджуються щоденно в одні й ті ж години доби: при хронічній дії дослідної речовини – протягом 2-х циклів кожного місяця, а при підгострій – 2 цикли з 10-денною перервою. Необхідно починати дослідження з першого дня дії речовини щоб вловити початкові зміни протягом естрального циклу, які можуть в подальшому виявитися тільки до кінця хронічного досліду або навіть в період відновлення.

Тривалість дослідження мазків обумовлена тим, що цей термін достатній для характеристики естрального циклу білих щурів і, крім того, виключає можливість розвитку вагінітів.

Співвідношення клітин у піхвових мазках щурів протягом естрального циклу  
(A.Thompson, 1990)

День циклу	Типи клітин		
	епітеліальні	ороговілі	лейкоцити
	чотириденний естральний цикл		
Проеструс	+++	++	±
Еструс	±	+++	—
Метаеструс	++	±	+++
Діеструс	++	+	+++
	п'ятиденний естральний цикл		
Проеструс	++	+++	—
Еструс	±	+++	—
Метаеструс	+++	±	+++
Діеструс I	++	+	+++
Діеструс II	+++	++	±

#### 4.2. Відносна маса яєчників і кількісна оцінка їх мікроструктури

По закінченні досліду тварини знеживлюються шляхом декапітації або розриву спинного мозку в шийному відділі, виймаються яєчники, які ретельно видаляються з оточуючої тканини, зважуються на торсійних або аналітичних вагах, після чого визначається відношення маси обох яєчників до маси тіла.

При цьому всі тварини знеживлюються в одній стадії, рекомендується проводити знеживлення в стадії еструс або проеструс. Останнє необхідне для подальшого підрахунку структурно-функціональних елементів в яєчнику і оцінки функціональної активності гіпофіза.

Треба зазначити, що правий і лівий яєчники за кількісним та якісним складом структурних компонентів мало відрізняються один від одного, тому підрахунок структурних елементів ведеться в одному яєчнику.

Яєчник фіксується в рідині Карнуа протягом 1,5 години в холодильнику, далі проходить через серію спиртів і суміші спирту з хлороформом (за загальноприйнятою методикою), після чого заливається в парафін. Готуються серійні зрізи яєчників за типом топографічних (через весь орган), товщиною в 6 мкм.

Препарати забарвлюють гематоксилін-еозином, підрахунок клітинних елементів яєчників проводять за Mandl, Zuckerman (1951, 1952):

- а) примордіальні фолікули і фолікули з одним шаром гранульозних клітин;
- б) фолікули з двома і більше шарами гранульозних клітин;
- в) зрілі фолікули (граафові пухирці);
- г) атретичні тіла і фолікули, які атретуються;
- д) жовті тіла;
- е) загальна кількість генеративних форм.

Вказані елементи підраховують по всій поверхні зрізу. Зрілі фолікули, фолікули з 2 і більше шарами гранульозних клітин, атретичні тіла враховуються в кожному 5-му зрізі і результат множать на 5. Примордіальні фолікули і фолікули з одним шаром гранульозних клітин підраховують в кожному 10-му зрізі (результати множать на 10). Жовті тіла враховують в середньому зрізі. При підрахунку структурно-функціональних елементів яєчника враховуються лише ті фолікули, які містять ядро з ядерцем.

Морфологічні зміни в репродуктивних органах щурів щодо стадій естрального циклу (за даними Центру міжнародних проектів, 1986) наведені в табл. 4.



**Морфологічні зміни в репродуктивних органах щурів відповідно до стадій естрального циклу**

Стадії циклу	Тривалість циклу, год.	Морфологія матки	Морфологія яєчника
Проеструс	12	Потовщена, заповнена рідиною, потовщена слизова оболонка	Збільшені фолікули
Еструс I	12	Максимальне розширення, рання регресія	Великі фолікули
Еструс II	15–18	Дегенеративні зміни в епітелії	Овуляція
Метаеструс	12	Початок регенерації епітелію	Яйцеклітина в яйцеводі
Діеструс	57–60	Регенеративний епітелій	Утворення жовтого тіла

Весь отриманий матеріал піддають статистичній обробці за класичним методом з використанням критерію Стюдента-Фішера для порівняння середніх величин.

### **4.3. Визначення гонадотропної функції гіпофіза**

Всі процеси розвитку фолікулів у яєчнику, а також характер естрального циклу знаходяться під регулюючим впливом гіпоталамо-гіпофізарних ділянок. Виходячи з цього, визначення активності гонадотропної функції гіпофіза складає необхідний елемент при оцінці функціонального стану яєчників. Вивчення активності функції гіпофіза проводиться за тестом на самках інфантильних мишей масою 3,5–4,0 г.

Виділений гіпофіз після зважування розтирається в фарфоровій ступці (окремо гіпофізи від щурів кожної групи) і суспензується в стерильному фізіологічному розчині, кількість якого в мл відповідає кількості гіпофізів. При цьому кількість інфантильних мишей-реципієнтів повинна бути на одного менша, тобто, якщо гіпофізи отримано від 10 щурів, то гіпофізарну суспензію вводять тільки 9 мишам-реципієнтам. Введення гіпофізарної суспензії проводять 2 рази на день протягом 3 днів під шкіру сшинки. На п'яту добу мишей-реципієнтів знеживлюють і визначають такі показники:

- а) відкриття статевої щілини;
- б) маса яєчників, матки та відносна маса яєчників і матки;
- в) наявність бюлтиунктів в яєчниках.

Маса яєчників і матки визначається на аналітичних вагах, після ретельного виділення названих органів з оточуючих тканин.

Збільшення відносної маси матки та яєчників самиць інфантильних мишей-реципієнтів, а також наявність бюлтиунктів свідчать про раннє статеве дозрівання мишей під впливом введеної гіпофізарної суспензії щурів. Порівняння проводиться з подвійним контролем: з мишами-реципієнтами, що отримали суспензію гіпофізів від контрольних щурів та з мишами, які не отримували гіпофізарної суспензії.

### **5. Дослідження здатності до запліднення або зачаття**

Інтегральною оцінкою дії фармакологічного препарату на статеву функцію є перевірка здатності лабораторних тварин до запліднення (самці) або до зачаття (самиці).

Вказані дослідження бажано проводити після хронічного введення, оскільки різні генерації сім'яродного епітелію неоднаково чутливі до дії хімічного агента, у зв'язку з чим тільки повторна дія досліджуваної сполуки на всі стадії сперматогенезу дозволяє виявити патологію.

Період сперматогенезу становить 35 днів у мишей, 48 днів у щурів, крім того, треба враховувати час, необхідний для проходження сперматозоїдів через придаток сім'яника, який становить від 1 до 2 тижнів.

Самці одразу після закінчення хронічної затравки спарюються з інтактними самками, що мають нормальний естральний цикл (або самиці відповідно із здоровими самцями) у співвідношенні 1:2. Така техніка підсадки забезпечує найбільшу кількість спарювань. Бажано підсаджувати самиць у стадії еструсу. Під час спарювання і всього терміну вагітності самиці не піддаються дії досліджуваної речовини.

Початком вагітності вважають день визначення в піхвовому мазку сперматозоїдів (у щурів) або піхвової пробки (у мишей).

Кількість самиць у групі, які завагітніли, є показником здатності самців до запліднення або до зачаття у самиць. Статистична достовірність відмінностей між результатами досліду і контролю визначають методом  $\chi^2$ .

На 17–21-й день вагітності частину самиць знеживлюють. Аналіз ембріонального матеріалу можна проводити за показниками, наведеними для вивчення ембріотоксичної дії отруйних речовин (див. далі). Другу половину вагітних самиць залишають до пологів. Дослідження отриманого потомства ведуть до 2-місячного віку з відсадкою від матері на 28-й день.

Ефект може бути обумовлений як порушенням систем і функцій безпосередньо в організмі потомства, так і дефектами вигодовування або порушенням материнського інстинкту у випадку дії отруйних речовин на самиць. Для диференціації причин рекомендується пересадка потомства від піддослідних самок до контрольних. Ця пересадка повинна проводитися з обережністю. Сисунці повинні бути покладені на деякий час у підстилку тієї клітки, куди вони підсаджуються, щоб відбити запах самиці, інакше вони можуть бути з'їдені прийомною матір'ю.

## **6. Вивчення впливу фармакологічних засобів на репродуктивну функцію**

### **6.1. Загальні положення**

Фармакологічні засоби можуть впливати на репродуктивну функцію, викликаючи не лише потворність або загибель ембріонів і плодів, а й порушуючи гаметогенез і перешкоджаючи заплідненню. Тому при оцінці фармакологічних речовин в рамках вивчення їх безпеки необхідно досліджувати їх вплив на репродуктивну функцію в модельних дослідах на самцях і самках, яких піддають дії препарату до спарювання.

Вивченню повинні підлягати всі фармакологічні речовини, які можуть бути призначені жінкам, що знаходяться у репродуктивному періоді життя, а також сполуки, які раніше не використовувались в медичній практиці. Виняток може бути зроблено для протипухлинних препаратів, якщо їх застосування обмежується лише онкологічною практикою.

До початку тестування необхідно мати відомості про фізико-хімічні властивості препарату, що вивчається; склад готової лікарської форми препарату; дози (летальна, ефективна, рекомендована для клінічних випробувань); ознаки інтоксикації, специфічні для даної речовини; способи введення, що рекомендуються; профіль фармакологічної дії; показання і схеми застосування препарату в клініці. Досліджувану речовину необхідно вводити тим способом, який передбачено при клінічному використанні. При пероральному способі використання речовину необхідно вводити зондом.

### **6.2 Основні правила вивчення впливу фармакологічних речовин на репродуктивну функцію**

Дослідження проводять на лінійних, гібридних або рандомбредних щурах. Речовину досліджують у трьох дозах. Дозу речовини, що тестується, розраховують на одиницю маси тіла сами-

ці. Найбільш доцільно, з точки зору подальшої інтерпретації результатів, проводити тестування речовини, використовуючи три дози: вищу, ефективно-терапевтичну (для цього виду тварин) і проміжну. Як вища використовується максимальна доза, при якій не спостерігається загибелі самиць і розвитку видимих ознак інтоксикації при обраній тривалості введення речовини. Цю дозу виявляють експериментально, враховуючи токсикологічну характеристику речовини ( $LD_{50}$ , кумулятивні властивості та ін.). Якщо при одноразовому введенні речовини, що вивчається, не можна ввести в такій дозі (наприклад, при дослідженні готової лікарської форми або малотоксичної сполуки), як вищу використовують дозу, що може бути досягнута за умов введення обраним шляхом максимальної кількості рідини для даного виду тварин. У разі виявлення ембріотоксичного ефекту у вищій або проміжній дозах, при широкому терапевтичному індексі речовини варто визначати порогову дозу за ембріотоксичною дією. В лабораторіях, що проводять тестування, необхідно мати дані про так званий «узагальнений» контроль (дані отримані на інтактних тваринах, що використовувалися як контрольні в попередніх дослідженнях, при збереженні стабільних умов їх утримання). Самцям препарат вводять протягом 60–70 днів, самкам – 15–30 днів. Потім тварин спарюють з інтактними самками і самцями. Рекомендується мати в кожній групі на початок спарювання не менше 20 самців і 40 самиць, у яких перед початком досліду перевірено естральний цикл. Самиць підсаджують до самців в стадії проєструсу в співвідношенні 2:1, терміном на 2 естральних цикли. Запліднення реєструють за допомогою вагінальних мазків. Половину вагітних самиць піддають евтаназії на 17–21 день вагітності, на розтині підраховують кількість жовтих тіл в яєчниках, місць імплантації в матці і кількість живих і загиблих плодів. На основі цих даних встановлюють рівень перед- та постімплантаційної смертності зародків. Крім того, підраховують індекс плодючості та індекс вагітності:

$$\text{індекс плодючості} = \frac{\text{кількість запліднених самок}}{\text{кількість самок, парованих із самцями}} \cdot 100 \%$$

$$\text{індекс вагітності} = \frac{\text{кількість вагітних самок}}{\text{кількість запліднених самок}} \cdot 100 \%$$

Половину самиць залишають до пологів і спостерігають за фізичним розвитком потомства до закінчення періоду вигодовування.

Необхідно мати на увазі, що пригнічення репродуктивної функції при тривалому введенні деяких фармакологічних речовин може бути обумовлено не лише порушеннями гаметогенезу, а й багатьма іншими причинами (зміна ендокринної функції, статевих залоз, гіпофіза, надниркових залоз, ураження гіпоталамуса, деяких інших центрів головного мозку і т.п.). Тому, якщо під дією тестованої речовини виникають порушення плодючості тварин, необхідно з'ясувати, залежить це від патології спермато- чи оогенезу, або від інших причин, використовуючи існуючі методи виявлення ушкоджуючої дії хімічних сполук на спермато- і оогенез. Вибір конкретних методів дослідження проводиться експериментатором.

## 7. Методи дослідження хромосом в гаметогенезі ссавців

Вивчення хромосом під час гаметогенезу, на послідовних стадіях нормального і патологічного ембріогенезу, є одним з ефективних підходів до пізнання механізмів реалізації генетичної інформації в індивідуальному розвитку. Ці дослідження можуть дати істотні відомості про механізм перозходження хромосом, які спричиняють зміни каріотипу, що лежать в основі хромосомних захворювань, а також дозволяють тестувати мутагенну активність різних хімічних речовин.

При роботі з суспензіями клітин потрібно мати холодильник (0–4°C), термостат (37°C), бінокулярну лупу МБС-1 або МБС-2. Для деяких методик необхідна центрифуга з регульованою швидкістю обертів (500–1500 об./хв). Весь посуд (пробірки, предметні скельця, трубки, з яких виготовляють мікропіпетки, та ін.) має бути з якісного скла. Перед використанням по-

суд ретельно мийуть пральним порошком в гарячій воді, потім добре промивають проточною і дистильованою водою та зберігають в суміші спирту і ефіру або дистильованій воді.

Реактиви (метиловий та етиловий спирти, льодяна оцтова кислота та ін.) треба брати найвищої якості, при чому доцільно піддавати їх додатковій очистці, що значно впливає на успіх роботи. Особливо важливо мати досить зневоднену льодяну оцтову кислоту і абсолютний спирт. Для забарвлення хромосом використовують орсеїн фірми "Gurr" або "Merck".

Більшість робочих розчинів доводиться готувати безпосередньо перед використанням, тільки деякі з них можуть зберігатися тривалий час. Готують такі робочі розчини:

1. *Гіпотонічний розчин* – 0,9%-ий водний розчин тризаміщеного цитрату натрію. Краще цей розчин готувати перед використанням, хоч можна використовувати розчин дво-, триденної давності.

2. *Фіксатор*. Змішати абсолютний метиловий спирт і льодяну оцтову кислоту в співвідношенні 3:1. Фіксууючу суміш необхідно завжди готувати безпосередньо перед використанням. Спирт зберігають в холодильнику при температурі 0°C, бо, змішуючи раніше охолоджений спирт з оцтовою кислотою, отримують фіксатор оптимальної температури.

3. *Фіксатор для сім'яників*. Безпосередньо перед використанням змішати охолоджений метиловий спирт, льодяну оцтову кислоту і хлороформ в співвідношенні 30:10:1.

4. *Розчин для розм'якшування*. Для сім'яників: змішати льодяну оцтову кислоту з 50% молочною кислотою в співвідношенні 3:1 або 4:1. Для зародків – змішати льодяну оцтову кислоту з 50% молочною кислотою в співвідношенні 3:2 або 3:1.

Розчини для розм'якшування готують в малих кількостях, безпосередньо перед використанням, через 1–2 години розчин стає повністю непридатний.

5. *Оцтово-кислий орсеїн (ацеторсеїн)*. Розчинити 2 г орсеїну в 100 мл 50% оцтової кислоти. Перед використанням обов'язково профільтрувати. Оцтовий орсеїн може зберігатися в темному посуді з притертою пробкою кілька місяців.

6. *Молочно-оцтовий орсеїн* – змішати в співвідношенні 1:1 льодяну оцтову кислоту і 50–60% молочну кислоту, обережно підігріти до 70–80° і додати орсеїн (з розрахунку 2–3 г на 100 мл суміші кислот). Необхідно помішувати до повного розчинення орсеїну, остудити, залишити на ніч, відфільтрувати і зберігати в темному посуді з притертою пробкою. Фарба зберігається добре. Перед використанням її обов'язково фільтрують. Для приготування тимчасових препаратів на предметне скло наносять кілька крапель свіжовідфільтрованої фарби і накривають покривним склом. Через кілька хвилин хромосоми фарбуються і препарат стає придатним для мікроскопічного аналізу. Такий препарат може зберігатися в холодильнику кілька днів. Щоб перевести тимчасовий препарат в постійний, необхідно, не зачіпаючи покривного скла, помістити предметне скло у вертикальному положенні в 50% оцтову кислоту. Коли покривне скло сповзе, сполоснути препарат в 70% спирті, провести по спиртах висхідної міцності і помістити в еупарал (з абсолютного спирту) або провести через ксилол і помістити у канадський бальзам.

7. *Розчин колхіцину або колцеміду*. Зручно приготувати маточний 1% розчин у дистильованій воді. Перед використанням з нього готують 0,02% розчин. Мишам і щурам колхіцин вводять інтраперитонеально з розрахунку 0,01–0,02 мг на 1 г маси тіла тварини.

8. *Фізіологічні (ізотонічні) розчини* – краще використовувати готові середовища (розчин Хенкса, середовище 199 та ін.), можна використовувати розчин Рингера, але при роботі з ранніми зародками цього робити не рекомендується.

### 7.1. Метод приготування хромосомних препаратів з чоловічих статевих залоз

Метод приготування мейотичних хромосом чоловічих статевих залоз мишей та інших дрібних тварин розроблено в лабораторії С.Е. Ford.

За 1,5 год до розтину миші ввести розчин колхіцину (колцеміду). Знеживити мишу, швидко видалити тестикул і помістити в чашку Петрі з теплим ізотонічним розчином. Очистити тестикул від жиру, розрізати капсулу, видалити пінцетом сім'яні каналці і розірвати їх на шматочки. Оптимальні результати залежать від того, наскільки вдало були подрібнені сім'яні каналці. При дуже сильному подрібненні в препаратах можуть траплятися шматочки каналців, а при недостатньо повному подрібненні каналців кількість клітин в препаратах зменшується. Особливо це впливає на сперматогонії, які залишаються в незруйнованих шматочках сім'яних каналців. Перенести вміст каналців до центрифужної пробірки ємністю 4 мл і обережно розпієтирувати. Потім центрифугувати 15 с при 500 об./хв для того, щоб осадити крупні шматочки каналців. Перенести надосадову рідину в чисту пробірку і центрифугувати 5 хв зі швидкістю 500 об./хв. Злити надосадову рідину, залишивши в пробірці мінімальний її об'єм. Ресуспендувати клітини в цій рідині і додати в пробірку приблизно 3 мл 1%-ого розчину цитрату натрію. Залишити на 10 хв, часом легко струшуючи пробірку. Відцентрифугувати (500 об./хв) 5 хв. Ретельно злити (всю!) надосадову рідину, а осад зафіксувати сумішню абсолютного етилового спирту, льодяної оцтової кислоти і хлороформу в співвідношенні 45:15:1. Можливі два варіанти фіксації, тому ще перед гіпотонізацією весь матеріал краще розділити на дві порції і фіксувати одним та другим способами. Можна швидко налити 0,5 мл фіксатора безпосередньо на осад, постукуючи пальцем по пробірці. Після чого наливають в пробірку приблизно 1,5 мл фіксатора, потім 3 хв центрифугують (500 об./хв) і двічі змінюють фіксатор.

Можна обережно влити 2 мл фіксатора по стінці пробірки і одразу вилити його. Потім ресуспендувати клітини і ще раз долити 1,5 мл свіжого фіксатора. Відцентрифугувати, видалити надосадову рідину, ресуспендувати клітини в мінімальному об'ємі фіксатора, що залишився, ще раз долити свіжу порцію фіксатора, залишити на 15 хв, потім повторити описану процедуру ще раз.

Оптимальна фіксація клітин досягається першим способом, коли фіксатор наливають у суспензію клітин і активно її перемішують. Однак при цьому багато клітин руйнується і втрачаються мейотичні та мітотичні хромосоми. Щоб уникнути цього вдаються до другого способу фіксації, але потрібно слідкувати, щоб клітинний осад на дні пробірки не був товщим ніж 2 мм, інакше якість хромосомних препаратів буде низькою.

Через 1–3 год після фіксації ще раз центрифугувати суспензію, злити надосадову рідину, ресуспендувати і налити в пробірку 0,5 мл свіжого фіксатора. Набрати в мікропіпетку необхідну кількість суспензії клітин і нанести на чисте знежирене предметне скло. Коли фіксатор почне підсихати, обережно подути на скло.

Для отримання хороших препаратів краще працювати з досить рідкою суспензією клітин. Після висихання перших крапель на предметне скло можна нанести ще кілька крапель суспензії клітин, слідкуючи, щоб краплі розтікались по склу і швидко висихали.

Для отримання хороших препаратів хромосом на стадії анафази I або анафази II потрібно або не користуватися гіпотонічним розчином, або тримати сім'яні каналці в ньому не довше 2 хв. Оптимальна концентрація цитрату натрію і тривалість дії гіпотонічного розчину підбираються залежно від виду тварин.

Метод С.Е. Ford та співробітників дає добрі результати, однак, як справедливо вказують автори даного методу, ці технічні прийоми не дають можливості дослідити мітози сперматогоній і непридатні для початкових стадій мейозу. Річ у тім, що при приготуванні з нефіксованих каналців суспензії ізольованих клітин і при дії гіпотонії відбувається втрата більшості сперматогоній під час метафази мейозу, а при центрифугуванні та зміні фіксатора легко руйнуються і втрачаються сперматоцити на стадії метафази II. У наведеній нижче методиці (Дибан, 1970) вилучено джерела можливих втрат клітин, що дозволяє працювати з дуже невеликою кількістю тканини та вивчати тонку будову хромосом протягом всього періоду сперматогенезу.

За 1–2 год до розтину ввести тварині колхіцин (колцемід). Вирізати сім'яники, помістити їх в гіпотонічний розчин (при кімнатній температурі) і після видалення капсули препару-

вальними голками звільнити звивисті сім'яні каналці. Через 5–7 хв матеріал перенести до посуду із свіжоприготованою і охолодженою до 0°C вищезазначеною фіксуючою сумішшю (краще користуватися невеликими скляними бюксами з кришками). Фіксатор обережно збовтати, швидко злити і долити в посуд нову порцію фіксуючої суміші. Об'єм фіксатора повинен перевищувати об'єм тканини, що фіксується, не менше ніж у 10 разів. Повторити цю процедуру 5–6 разів. Залишити матеріал в останній порції фіксатора в закритому посуді на ніч при 0°C. Тканини сім'яника можна зберігати понад тиждень при 4°C, періодично замінюючи фіксуючу суміш. Приступаючи безпосередньо до приготування хромосомних препаратів, невелику кількість зафіксованого матеріалу перенести в маленьку склянку, в яку долито кілька крапель суміші для розм'якшування, і залишити на 4–5 хв. Обережно розмішати вміст препарувальною голкою. Мікропіпеткою перенести на чисте знежирене предметне скло кілька крапель суспензії клітин і дати їм розтектися по поверхні. Не допускаючи висихання (слідкувати за появою в центрі краплин, що розтікаються, матових кілець), нанести зверху кілька крапель фіксуючої суміші, після чого швидко додати 2–3 краплі абсолютного метилового спирту. Подути, сушити під електричною лампою, фарбувати молочно-оцтовим орсеїном.

### ***7.2. Приготування хромосомних препаратів жіночих гамет***

У ссавців початкові фази мейозу в оогенезі (від лептотени до диктіотени) відбуваються ще під час внутрішньоутробного періоду розвитку, тобто ці фази треба досліджувати в яєчниках плодів. Оскільки статеві залози в цей час мають дуже щільну консистенцію, вдаються до комбінованої дії на яєчники гіпотонічних розчинів і ферментів, тобто води з додаванням кристалічного трипсину.

Препарований яєчник плодів щура або миші цілком занурюють у насичений розчин трипсину в дистильованій воді (звичайно на 15–25 хв при температурі 37°C). Для цього підходить невеликий скляний посуд діаметром і висотою близько 1 см, наприклад, відрізане денце від пробірок. Під контролем бінокулярної лупи обережно відсмоктують мікропіпеткою розчин трипсину, звертаючи увагу на те, щоб не втратити яєчник, потім наливають в посудину гіпотонічний розчин цитрату натрію, прополіскують яєчники і кілька разів міняють розчин. Тривалість прополіскування цитратом близько 2–3 хв. Потім наливають у посуд фіксатор і через 2–3 хв міняють його. Цю процедуру повторюють 3–5 разів, після чого яєчник переносять у свіжу порцію фіксатора і залишають в закритому посуді (наприклад, у бюксі з кришкою) на ніч при температурі 4°C. Зранку можна з яєчника готувати препарати. Для розм'якшування тканин яєчника використовують суміш молочної і оцтової кислот в співвідношенні 1:2. Інші етапи такі ж, як при приготуванні препаратів з сім'яників за методом А.П.Дибана (1970).

Діакінез і метафазу I досліджують в овульованих незапліднених яйцеклітинах, закінчення другого поділу дозрівання – в запліднених яйцеклітинах.

Для отримання великої кількості яйцеклітин застосовують індуковану суперовуляцію. Для цього мишам вводять 5 МО сироватки жеребої кобили (СЖК) і через 48 год 5 МО хоріально-го гонадотропіну. Для дослідження метафази I самиць розтинають через 7–10 год після другої ін'єкції. Яєчник відсепаровують, вміщують у фізіологічний розчин і під контролем бінокулярної лупи проколюють Граафові пухирці. Ооцити переносять в нову порцію фізіологічного розчину з додаванням кристалічної гіалуронідази і після промивки чистим фізіологічним розчином готують хромосомні препарати за методом Тарковського.

Дослідження метафази II проводять через 12–16 год після другої ін'єкції. У цей час овульовані яйцеклітини вже знаходяться в ампулярній частині яйцеводу. Тому для отримання яйцеклітин обережно виділяють яйцеводи і препарувальними голками розривають розширений ампулярний кінець. Оточені фолікулярним епітелієм яйцеклітини вміщують у теплий

фізіологічний розчин з кристаликами гіалуронідази і потім готують препарати за методом Тарковського.

Метафазу I можна також досліджувати в незапліднених яйцеклітинах, які культивують *in vitro* за методом Едвардса. З цією метою вирізають шматочок яєчника і кілька раз промивають його теплим фізіологічним розчином. Під контролем біокулярної лупи виділяють кілька Граафових пухирців і поміщають їх у середовище 199 з додаванням 15%-ної інактивованої телячої сироватки і антибіотиків (пеніциліну, стрептоміцину – 100 ОД/мл, гепарину 1 ОД/мл і 5%-го фосфатного буфера – рН 7,0) Для отримання ооцита належить проколоти фолікул, і ооцит перенести в свіжу порцію поживного середовища без гепарину, яка містить замість фосфатного буфера бікарбонат натрію. За допомогою мікропіпетки яйцеклітину поміщають у краплю поживного середовища в чашці Петрі під шар парафінового масла (стерильно) і культивують в термостаті (37°C) у суміші повітря з 5% CO<sub>2</sub>. Через різні проміжки часу від початку культивування яйцеклітини використовують для приготування хромосомних препаратів за методом Тарковського.

## 8. Основні поняття та терміни

**Атретичне тіло** – утворюється в результаті розростання клітин внутрішньої теки після атреції фолікула яєчника, що росте.

**Блютпункт** – точечний крововилив

**Ембріотоксичність** – це потенційна можливість сполуки чинити ушкоджуючу дію на потомство, що проявляється підвищеною ембріональною смертністю на різних стадіях розвитку (ембріолетальна дія), або виникненням вад розвитку та відхилень від норми в постнатальному періоді (тератогенна дія).

**Гонади** – органи, в яких утворюються статеві клітини; розрізняють Г. жіночі (яєчники) та чоловічі (яєчка).

**Гонадотоксичність** – властивість речовини токсично діяти на статеві залози (гонади).

**Диктіотена** – специфічна стадія мейозу жіночих статевих клітин, що настає після закінчення профазы.

**Жовте тіло** – тимчасова ендокринна залоза, що періодично формується у яєчнику на місці післяовуляторного фолікула.

**Жовте тіло вагітності** – жовте тіло, яке функціонує в яєчнику протягом усього періоду вагітності.

**Імплантація** – занурення зародка в слизову оболонку матки.

**Лактація** – процес виділення молока молочною залозою.

**Лептотена** – перша стадія профазы мейозу, у якій в ядрах гаметоцитів першого порядку з'являються хромосоми, що мають вигляд тонких ниток.

**Органогенез** – сукупність процесів формування та розвитку органів.

**Примордіальний фолікул** – первинний ооцит на стадії диплотени профазы мейозу в оточенні одного шару плоских фолікулярних клітин.

**Сперматогенез** – розвиток чоловічих статевих клітин – сперматозоїдів, здійснюється в звивистих сім'яних каналцях яєчка.

**Сперматоцити** – проміжні клітинні форми, що виникають у процесі сперматогенезу; розрізняють первинні та вторинні С.; первинні утворюються із сперматогоній при їх диференціюванні під впливом тестостерону; вторинні С. розвиваються із первинних по завершенні ними першого (редукційного) поділу.

**Фолікул яєчника** – загальна назва структур паренхіми яєчника, що складається з ооцита, оточеного фолікулярним епітелієм.

**Фолікул яєчника третинний** (Граафів пухирець) – великий фолікул яєчника, готовий до овуляції.

**Література**

1. Гигиеническая оценка новых пестицидов. Метод. указания/ ВНИИГИНТОКС МЗ СССР.– К., 1969.
2. Гістологічний тлумачний словник/Луцик О.Д., Іванова А.Й., Кабак К.С.– Львівський мед. інститут, 1994.– 320 с.
3. Дыбан А.П. Раннее развитие млекопитающих.– Л.: Наука, 1988.– 258 с.
4. Дыбан А.П. Метод приготовления препаратов митотических и мейотических хромосом из семенников млекопитающих//Цитол.– 1970.– 12, № 5.– С. 687–688.
5. Егорова Г.М., Иванов Н.Г., Саноцкий И.В. Токсикология новых промышленных химических веществ.– Л.: Медицина, 1966.– С. 33.
6. Западнюк И.П., Западнюк В.И., Захария Е.А. Лабораторные животные, их разведение, содержание и использование в эксперименте.– К.: Гос. мед. изд-во, 1962.– 343 с.
7. Изучение эмбриотоксического действия фармакологических веществ и влияния их на репродуктивную функцию. Метод. указания/А.П.Дыбан и соавт.– М., 1986.– 24 с.
8. Лакин Г.Ф. Биометрия.– М.: Высшая школа, 1973.– 335 с.
9. Лекарственные средства. Биоскрининг. Пер. монографии А.Thompson: Drug bioscreening, 1990/Под ред. А.В.Стефанова.– К., 1998.
10. Методы экспериментального исследования по установлению порогов действия промышленных ядов на генеративную функцию с целью гигиенического нормирования/МЗ СССР.– М., 1978.– 35 с.
11. Методы биологии развития.– М.: Наука, 1974.– 617 с.
12. Милованов В.К. Биология воспроизведения и искусственного осеменения у животных.– М.: Изд-во с/х литературы, журналов и плакатов.–1962.– С. 696–701.
13. Оксенгендлер Г.И. Яды и организм: Проблемы химической опасности.– СПб: Наука, 1991.– С. 69–106.
14. Принципы оценки риска для потомства в связи с воздействием химических веществ в период беременности: Совместное издание программы ООН по окружающей среде Международной Организации Труда и Всемирной Организации здравоохранения.– М.: Медицина, 1988.– 155 с.
15. Саноцкий И.В., Фоменко В.Н. Отдаленные последствия влияния химических соединений на организм.– М.: Медицина, 1979.– 225 с.
16. Торчинский А.М. и соавт. Научно-методологические аспекты биологических исследований новых лекарственных препаратов//Мат. Всесоюзн. симп. по целенаправленному изысканию физиологически активных веществ.– Рига: Зинатне, 1987.– С. 308–317.
17. Трахтенберг И.М. и соавт./Под ред. И.М.Трахтенберга. Genotoxicity, carcinogenicity and reproductive toxicity. Internacionol Standart. ISO.10993–3: 1992 (E).
18. European Commission of the European Communities. Council Directive of 18 December 1986 on the Laws, regulating the Application of principles of Good Laboratory Practice and the Veriffication of their Applications for Tests on Chemical Substances (87/18 EEC). The rules Governing Medicinal Products in the Community, V.I. 1, Sept.,1991, P. 145–146.
19. Ford C.E., Woolam D.N., Colchicine hypotonic citzate air-drying sequence for foetal mammalian chromosomes //Stain. Techology. – 1963.– 38, №2. – P.271–277.
20. International registry of Chemical currently being tested for toxic effect (CCIIE), June, 1992 (Geneva): UNEP/GLO/WHO, 1992.– 326 p.
21. Principles and metods of toxicology/2nd ed. A.W.Hayes.– New York: Raven Press, 1989.– 929 p.
22. Wright P.L. Цитується за методич. реком. “Использование метода нескольких поколений для изучения состояния репродуктивной функции лабор. животных в токсиколого-гигиенических экспериментах. Киев, 1984.–12с. Авторы: Марцань Л.В., Шепельская Н.Р.



# ДОКЛІНІЧНЕ ВИВЧЕННЯ ВПЛИВУ ЛІКАРСЬКИХ ЗАСОБІВ, ЩО ЗАСТОСОВУЮТЬСЯ ПІД ЧАС ВАГІТНОСТІ, НА НЕЙРОЕНДОКРИННІ СИСТЕМИ РЕГУЛЯЦІЇ РЕПРОДУКЦІЇ ТА АДАПТАЦІЇ У НАЩАДКІВ

Резніков О.Г.,  
Носенко Н.Д.

## Перелік скорочень

**АКТГ** – адренокортикотропний гормон  
**ГГНС** – система гіпоталамус-гіпофіз-кора надниркових залоз  
**ДА** – дофамін  
**11-ГКС** – 11-гідроксикортикостероїди  
**ЛГ** – лютеїнізуючий гормон  
**ЛГ-РГ** – ЛГ-релізінг-гормон  
**МБГ** – медіобазальний гіпоталамус  
**МПЯ** – медіально-преоптичне ядро  
**МПТ** –  $\alpha$ -метил-пара-тирозин  
**НА** – норадреналін  
**ПД** – преоптична ділянка  
**СДМ** – статева диференціація мозку  
**СХЯ** – супрахіазматичне ядро  
**Т** – тестостерон  
**ФСГ** – фолікулостимулюючий гормон

## Вступ

Методичні рекомендації складено згідно з Правилами доклінічної оцінки нешкідливості фармакологічних засобів (GLP) та матеріалів Міжнародної організації із стандартизації (ISO). При підготовці рекомендацій враховували досвід експериментальних та клінічних досліджень в Україні та зарубіжних країнах стосовно віддалених наслідків впливу різних хімічних сполук та лікарських засобів, що застосовуються під час вагітності, на розвиток нейроендокринних систем репродукції та адаптації у нащадків. Як головний об'єкт вивчення адаптивних реакцій обрано систему гіпоталамус-гіпофіз-кора надниркових залоз (ГГНС), яка забезпечує перебіг загального адаптаційного синдрому.

Виявлення цих потенційно небезпечних препаратів на стадії доклінічних досліджень править за протипоказання для їх клінічного застосування. Однак відсутність тератогенного ефекту не

виключає можливість виникнення тяжких функціональних розладів з боку репродуктивних та адаптаційних функцій і загальної неспецифічної резистентності організму, які виявляються у нащадків лише по досягненні зрілого віку у вигляді безпліддя, аномалій статевої поведінки, послабленої реактивності ГГНС. Як правило, причиною цих розладів є порушення нормального процесу розвитку нейроендокринних центрів головного мозку. Численні наукові дані свідчать про те, що деякі фармакологічні речовини і ксенобіотики негативно впливають на розвиток плоду і здійснюють ембріолетальну, тератогенну, ембріотоксичну та фетотоксичну дію.

У сучасній медицині перелік лікарських засобів, які призначають жінкам під час вагітності, вкрай обмежений. Проте, за наявності медичних показань (загроза переривання вагітності та викидня, артеріальна гіпертензія, незадовільний стан плоду, нейровегетативні розлади, нефропагія, серцева недостатність та інші види екстрагенітальної патології у вагітних тощо), вимушено призначають гормональні, протисудомні, гіпотензивні, седативні, кардіотропні засоби, антибіотики, вітамінно-мінеральні комплексні препарати.

Виявлення цих порушень в дослідженнях на тваринах потребує спеціальних експериментальних підходів. Воно сприятиме своєчасному попередженню застосування під час вагітності фармакологічних препаратів, які є потенційно небезпечними для розвитку плоду. Доклінічний перевіряє нешкідливості потенційних лікарських засобів згідно з даними рекомендаціями підлягають в першу чергу стероїдні гормони (гестагени, андрогени, естрогени, глюкокортикоїди), їх агоністи та антагоністи, а також психо- та нейротропні препарати.

### **1. Загальні положення досліджень**

#### **1.1. Тварини**

Дослідження проводять на ссавцях (щурах, мишах, кролях, золотистих хом'ячках, морських свинках), враховуючи особливості будови та функції їх репродуктивної системи та ГГНС. Найбільш придатними є білі щурі (лінійні або інбредні), тому що вони мають однаковий з людиною тип плаценти (гемохоріальний), а також завдяки коротким термінам вагітності (21–22 доби), статевого дозрівання (40–45 діб) і естрального циклу (4–5 діб). При вивченні впливу фармакологічних речовин на розвиток нейроендокринної системи репродукції є можливість вводити їх не тільки під час вагітності, а й новонародженим щурам і мишам, оскільки статеві диференціація мозку (СДМ) в них, на відміну від людини, завершується протягом перших діб після народження. Це дещо спрощує проведення таких експериментів.

Існують чітко виражені статеві відмінності нейроендокринної регуляції репродуктивних функцій (циклічний характер у самок, ациклічний – у самців) та стрес-реактивності ГГНС (більш висока у самок). Тому досліджувана патологія має різні прояви у особин жіночої і чоловічої статі. Це зумовлює необхідність проведення експериментів на тваринах обох статей.

#### **1.2. Утримання та формування груп тварин**

Обов'язковою передумовою утримання тварин є постійна температура та достатня вентиляція приміщення, регулярний світловий режим, повноцінне харчування, запобігання стресовим чинникам.

Для проведення експериментів необхідно мати самок з датованою вагітністю. Для запліднення відбирають статевозрілих самок щурів масою тіла 180–220 г з регулярним естральним циклом. Перед цим протягом 2-х тижнів проводять мікроскопічне дослідження вагінальних мазків. Самок, які знаходяться в стадії еструсу чи проеструсу, підсаджують до статевозрілих самців у співвідношенні 2:1. Наявність сперматозоїдів у вагінальних мазках, взятих вранці наступного дня, свідчить про настання вагітності (1-й день). За відсутності сперматозоїдів у вагінальних мазках самок залишають у клітці з самцем ще на одну добу за умови, що перша

підсадка була зроблена в стадії проєструсу. З 15-ої доби вагітності щурів утримують поодиноці в окремій клітці.

З вагітних щурів формують 2 групи тварин: одна – для введення досліджуваної речовини (дослідна), друга – для введення розчинника або носія (контрольна). У разі вивчення репродуктивних функцій у нащадків у кожній групі має бути не менш як по 10 вагітних щурів, тоді як для вивчення стану ГНС достатньо мати по 5 самиць.

Важливе значення має приблизно однакова кількість новонароджених щурят (не більше 6–8), які годуються однією матір'ю. Тому на 5–6-у добу після пологів проводять відповідний перерозподіл щурят в межах однієї групи (дослідної або контрольної) з урахуванням дати народження.

Через місяць після народження молодих щурів сортирують за статтю, маркують і розміщують по 5 тварин в клітці. З новонароджених або молодих нащадків формують основні групи тварин для подальших досліджень. Кількість тварин визначається залежно від конкретної мети та об'єкту дослідження. Для отримання репрезентативних даних рекомендується формувати дослідні і відповідні контрольні групи з нащадків одного приплоду.

### **1.3. Дози і способи введення фармакологічних препаратів**

При проведенні даного виду досліджень можна обмежитись однією дозою фармакологічного препарату, розраховуючи її на одиницю маси тіла вагітної самки. Використовується максимально ефективна терапевтична доза для даного виду тварин з урахуванням можливої побічної дії на організм матері і плода. Погіршення загального стану вагітної тварини, загибель чи затримка соматичного розвитку ембріонів і плодів зумовлює необхідність зниження дози. Також треба враховувати кумулятивні властивості досліджуваної речовини, тривалість та спосіб її введення. Лімітуючими факторами можуть бути токсичність розчинника та об'єм розчину чи іншої лікарської форми.

При введенні фармакологічного препарату вагітним тваринам обирають той спосіб, який пропонується для клінічного застосування. За умови, якщо цей спосіб не можливо використати в експерименті, дослідник може обрати інший шлях. Перевагу надають підшкірному і внутрішньом'язовому способам введення перед іншими, які викликають більш виражений стрес. Якщо об'єм препарату для ін'єкції разової дози є надмірним, рекомендується вводити його частками у різні місця тіла. Кількість введень препарату протягом доби залежить від фармакокінетичних характеристик досліджуваної речовини. Надзвичайно обережного поводження під час введення препаратів потребують новонароджені тварини. Препарати вводять під шкіру спини, об'єм розчину не повинен перевищувати 0,05 мл, в крайньому випадку 0,1 мл.

### **1.4. Терміни введення фармакологічних препаратів**

Після завершення органогенезу в період внутрішньоутробного розвитку ембріону починається складний процес диференціації та дозрівання нейро-ендокринних центрів регуляції фізіологічних функцій. Цей процес контролюється гормонами, нейромедіаторами та іншими біологічно активними речовинами, які програмують подальший розвиток мозку [1]. Саме в ці критичні періоди онтогенезу виявляється найбільша чутливість незрілих нейроендокринних систем репродукції та адаптації до ушкоджуючого впливу нейротропних, гормональних речовин, їх агоністів та антагоністів. Критичний період СДМ у людей, кролів, морських свинок, золотистих хом'яків припадає на середину або кінець вагітності, а у щурів і мишей – на кінець вагітності та перший тиждень після народження.

Беручи до уваги хронологічну послідовність розвитку нейроендокринних систем в ранньому онтогенезі ссавців та наявність критичних періодів цього розвитку, досліджувані препарати вводять вагітним щурам, починаючи з 15-ої доби до кінця вагітності, а новонародженим – протягом першого тижня постнатального життя.

### **1.5. Строки та об'єкти досліджень**

Основні дослідження стану нейроендокринних систем репродукції і ГГНС проводять на статевозрілих (3–6 міс) тваринах. Для додаткових поглиблених досліджень використовують щурів раннього постнатального віку (7–10 діб). Залежно від конкретної мети досліджень та віку тварин, об'єктами досліджень є головний мозок, гіпофіз, гонади та інші органи статеві системи, надпиркові залози, кров.

Чутливими показниками нейроендокринних розладів є вміст та метаболізм нейротрансмітерів, стероїдних гормонів, нейропептидів, а також стан системи гормональних рецепторів у дискретних ділянках мозку, причетних до нейроендокринної регуляції статевої поведінки, процесів репродукції та адаптації, у співставленні з морфологічними характеристиками досліджуваних структур. Гістологічні дослідження гіпофіза, кори надпиркових залоз, органів статевої системи дають цінну інформацію про їх функціональний стан, який залежить від нейроендокринної регуляції. Вони доповнюються результатами вимірювань біохімічних показників у тканинах. Кров використовують для визначення в ній вмісту гормонів.

Всі морфологічні та функціональні дослідження у самок проводять з обов'язковим урахуванням стадії естрального циклу, яку визначають шляхом світлової мікроскопії вагінальних мазків.

Окрім базальних показників, які вивчаються в умовах фізіологічного спокою, використовують різноманітні функціональні тести, результати яких дають змогу оцінити стан негативних і позитивних зворотних гормональних зв'язків у гіпоталамо-гіпофізарно-гонадній системі та ГГНС, реактивність і функціональні резерви центральної нервової системи та ендокринних залоз.

Для оцінки безпечності препаратів у даному аспекті обов'язковим слід вважати додержання рекомендацій, викладених у п.п. 2.1.1, 2.1.3, 2.2.1, 2.2.3, 3.1 та 3.3.

## **2. Дослідження впливу фармакологічних препаратів на нейроендокринну регуляцію репродуктивної функції**

### **2.1. Основні критерії порушень нейроендокринної регуляції репродуктивної функції у самок**

#### *2.1.1. Морфологічна характеристика та функціональний стан органів статевої системи*

Одразу після народження піддослідних тварин слід звертати увагу на аногенітальну відстань. Зменшення її у самців та збільшення – у самок є ознакою тератогенності відносно статевої системи і робить недоцільними подальші дослідження згідно з даними методичними рекомендаціями. За відсутності цих ознак експеримент продовжують.

Першою видимою ознакою порушення нейроендокринної регуляції репродуктивної системи під впливом фармакологічного препарату нерідко є зміна темпу статевого дозрівання. Завершення пубертації у самок щурів досить легко визначається часом відкриття піхви. Для цього тварин дослідної та контрольної груп (по 10 тварин у кожній) щоденно обстежують, починаючи з 30-ої доби життя. Строки відкриття піхви залежать від лінії щурів, умов їх утримання і регулярності світлового режиму. Наприклад, у щурів лінії Вістар воно відбувається в середньому на  $41 \pm 2$  добу життя. Зазвичай, перша овуляція настає наступного дня після відкриття піхви, що супроводжується першою тічкою. Згодом встановлюється регулярний естральний цикл.

Передчасне чи затримане відкриття піхви є ймовірним свідченням нейроендокринних порушень. При тяжких формах порушень СДМ у самок за чоловічим типом (маскулінізація мозку) піхва може взагалі не відкритися. Проте необхідно підкреслити, що відсутність цих змін ще не є підставою для припинення подальших досліджень на дорослих тваринах.

У щурів віком 3–5 міс вивчають тривалість та структуру естральних циклів за даними світлової мікроскопії вагінальних мазків протягом 3 циклів (12–15 діб). Мазки беруть у першій половині дня, бажано в один і той же час, використовуючи зволожені дистильованою водою або фізіологічним розчином ватні тампони на сірнику. За цитологічним складом визначають стадії циклу (проеструс, еструс, метаеструс, діеструс).

Порушення статевої циклічності виявляється як зміна структури та тривалості циклу за рахунок подовження стадії еструсу або діеструсу. При важких формах нейроендокринних розладів естральні цикли відсутні, проявом чого є персистентний еструс чи діеструс. Передчасне відкриття вагіни та стан персистентного еструсу є типовими проявами порушень СДМ.

Після завершення дослідження статевої циклічності контрольних і піддослідних самок (у відповідній стадії естрального циклу) зважують і знеживлюють під легким ефірним наркозом шляхом декапітації. Кров, що витікає з судин шиї, збирають у центрифужні пробірки, які містять одну краплю розведеного фізіологічним розчином (1:2) офіціального розчину гепарину для ін'єкцій. Аліквоти плазми використовують для подальшого визначення вмісту гормонів.

На розтині вилучають і зважують яєчники і матку (до та після видавлювання з неї рідини). Ці органи фіксують у рідині Буена або Карнуа з метою гістологічного вивчення за загальноприйнятою методикою [2]. Доцільно також використати органи цих тварин (головний мозок, гіпофіз, надниркові залози) для додаткових біохімічних та гістологічних досліджень.

У тварин з порушеною нейроендокринною регуляцією оваріального циклу, яка призводить до ановуляторного стану, спостерігається атрофія яєчників, розростання в них сполучної тканини, відсутність справжніх жовтих тіл з численними крупними, але незрілими фолікулами, поодинокими або численними фолікулярними кістами. Маса матки, як правило, зменшується, спостерігається гіпертрофія та гіперплазія поверхневого епітелію ендометрія матки, поверхня ендометрія згладжена, залози розвинуті недостатньо.

У плазмі крові вимірюють вміст основних статевих гормонів – естрадіолу та прогестерону – за допомогою радіоімунологічного чи імуноферментного методів. Для цього придатні комерційні набори реагентів, які призначені для визначення відповідних гормонів у плазмі крові людини. Суттєвим доповненням до одержаних результатів можуть бути дані про рівень у плазмі крові гонадотропних гормонів гіпофіза – лютеїнізуючого (ЛГ) та фолікулостимулюючого (ФСГ). Проте слід враховувати, що через видові розбіжності будови та імунореактивності, комерційні набори для визначення гонадотропінів у людини неможливо використовувати для цих досліджень у тварин.

Якщо в розпорядженні експериментатора немає видоспецифічних реагентів (наборів) для визначення концентрації імунореактивних гонадотропінів, можна застосувати методику визначення біологічно активного ЛГ в плазмі крові [3]. Реєструють як базальні рівні гормонів у міжтечковий період, так і наявність їх коливань згідно стадіям естрального циклу. Стан ановуляції у щурів супроводжується дещо підвищеним базальним рівнем ЛГ, зниженням рівня прогестерону, відсутністю преовуляторного викиду гонадотропних та статевих стероїдних гормонів.

### *2.1.2. Оцінка регуляції секреції гонадотропних гормонів*

Порушення морфологічної будови, генеративної та ендокринної функцій яєчників у щурів, які зазнали впливу фармакологічних препаратів під час внутрішньоутробного або раннього постнатального розвитку, може бути наслідком їх прямої гонадотоксичної дії або нейроендокринних розладів. Для того, щоб диференціювати ці два механізми, потрібні спеціальні дослідження. Надійним доказом нейроендокринних порушень є результат тестування гіпоталамічної регуляції секреції ЛГ.

Регуляція секреції ЛГ у ссавців здійснюється шляхом негативного та позитивного зворотних зв'язків між гіпоталамо-гіпофізарною системою та яєчниками. За головний гормональ-

ний сигнал для гальмування чи активізації послідовної секреції ЛГ-рилізінг-гормону (ЛГ-РГ) та ЛГ править рівень естрогенів у крові. Стимуляція естрогенами секреції ЛГ наприкінці фолікулярної фази оваріального циклу є обов'язковою передумовою овуляції. Одночасне порушення позитивного і негативного зворотних зв'язків в системі нейроендокринної регуляції репродукції є найважливішою ознакою ушкодження СДМ та ановуляції.

Для тестування порушень секреції гонадотропінів за механізмом негативного зворотного зв'язку можна рекомендувати кілька методів. Найпростіший з них полягає у вивченні ступеня компенсаторної гіпертрофії яєчника після геміоваріектомії [1]. У інтактних (контрольних тварин) це має призводити до збільшення маси яєчника за рахунок підвищення рівня гонадотропінів у крові. Ступінь цього підвищення збільшується у разі двосторонньої оваріектомії. Паралельне вимірювання концентрації ЛГ в плазмі крові або сумарної гонадотропної активності в гомогенаті аденогіпофіза (через 3–5 діб після операції) надає більш точну інформацію про стан негативного зворотного зв'язку. Найбільш чіткі результати експериментів з компенсаторною гіпертрофією яєчників демонструють, якщо операція виконується на молодих тваринах, наприклад, у 2-місячному віці.

Інший підхід для вивчення негативного зворотного зв'язку полягає у гальмуванні секреції гонадотропінів під впливом естрогенів. У статевозрілих піддослідних та контрольних самок видаляють яєчники. Через тиждень після операції їм вводять під шкіру одноразово естрадіолу бензоат в дозі 3–5 мкг на тварину. Через 24 год після ін'єкції збирають кров для визначення в ній концентрації ЛГ. Достовірна різниця між ступенем зменшення ЛГ в плазмі крові у піддослідних і контрольних щурів свідчить про різну чутливість гіпоталамічних центрів нейроендокринної регуляції секреції ЛГ до гальмуючої дії естрогенів.

Найбільш надійною ознакою збереження позитивного зворотного зв'язку в ланцюгу «естрогени-гонадотропіни» вважають підвищення рівня ЛГ у крові оваріектомованих щурів, яке настає після введення їм великої дози естрогену. Методика такого дослідження передбачає пастунні маніпуляції. У піддослідних і контрольних тварин вилучають обидва яєчники. Через 3–5 діб після операції одноразово підшкірно вводять естрадіолу бензоат в дозі 15 мкг/100 г маси тіла. Треба також мати групи піддослідних і контрольних тварин, яким замість естрадіолу бензоату вводять розчинник з метою подальшого визначення базального рівня ЛГ в плазмі крові. Через 48 год після ін'єкції естрадіолу або розчинника забирають кров для визначення в ній концентрації ЛГ. В разі неадекватної реакції з боку ЛГ на естрогени у піддослідних тварин в порівнянні із контрольними роблять висновок про пошкодження позитивного зворотного зв'язку. Обчислюють різницю між базальним рівнем ЛГ та після введення естрадіолу бензоату.

Якщо у експериментатора відсутні технічні можливості для визначення рівня ЛГ у крові, рекомендується використати інші функціональні тести. Один з них полягає в тому, що оваріектомованим у статевозрілому віці піддослідним та контрольним тваринам у передню камеру ока імплантують половинку яєчника незрілої самки із ще нерозкритою вагіною (36–38-денного віку). Через 15 діб після операції трансплантат вилучають із камери ока і фіксують у розчині Буена для гістологічного аналізу. Серійні зрізи фарбують гематоксилін-еозином, вивчають під мікроскопом кожний 10–12-й зріз. Відсутність справжніх тіл у імплантованому яєчнику свідчить про порушення регуляції секреції ЛГ за механізмом негативного зворотного зв'язку.

Оскільки деякі фармакологічні препарати за умов їх внутрішньоутробного або раннього перинатального введення здатні змінювати чутливість гонадотропінів гіпофіза молодих і дорослих щурів до гіпоталамічного ЛГ-РГ, доцільно провести відповідне дослідження. У піддослідних статевозрілих щурів і контрольних тварин у відповідній стадії естрального циклу під легким ефірним наркозом гострими ножицями надрізають під'язикову вену і відбирають зразки крові для визначення базального рівня ЛГ у плазмі. Одразу після цього їм вводять в вену хвоста 25 нг синтетичного ЛГ-РГ і через 15 хв повторно беруть кров з під'язикової вени з наступ-

ним визначенням концентрації ЛГ у плазмі. Результати тесту оцінюють, порівнюючи приріст вмісту ЛГ над базальним його рівнем у піддослідних і контрольних тварин.

У зв'язку з тим, що можливий різний рівень статевих гормонів у тварин піддослідної та контрольної групи обумовлює різну чутливість гонадотропоцитів аденогіпофіза до ЛГ-РГ, більш надійні результати отримують, якщо тестування проводять на попередньо оварієктомованих щурах із наступною замісною терапією естрадіолу бензоатом (по 1 мкг протягом 3–5 діб).

### 2.1.3. Статева поведінка та плодючість

Експериментальні та клінічні спостереження вказують на можливість появи гомо- або бісексуальної поведінки як наслідок застосування під час вагітності дексаметазону, деяких синтетичних естрогенів, прогестинів та інших гормональних та антигормональних засобів. Характеристика і механізми цих порушень найбільш ретельно вивчені у самок щурів, які в перші дні після народження піддавались навіть короткочасній дії пренаратів, яким притаманна андрогенна чи естрогенна активність.

Статева поведінка у самок проявляється у вигляді процептивних та рецептивних реакцій. Останні виявляються лише у стадії еструсу і тому у тварин із порушеним естральним циклом можуть бути досліджені за спеціальною методикою, яка передбачає попередню оварієктомію і буде викладена нижче.

У першому наближенні якісна і кількісна оцінка статевої поведінки у піддослідних і контрольних самок може бути одержана на тваринах з інтактними яєчниками. Перед тестуванням у самки беруть вагінальний мазок для визначення стадії естрального циклу. Для досліджень найбільш придатні тварини в стадії еструсу.

Для тестування жіночої статевої поведінки самок розміщують по одній у просторій клітці, де знаходиться активний самець. Тестування проводять протягом 10–15 хв у сутінковий час доби або під слабким червоним світлом. Проявами процептивної поведінки (залицання) є наближення до самця, обнюхування його статевих органів, стрибки (підвищена рухова активність), покусання вух та інші ознаки. Кількість наближень самки до самця характеризує індивідуальну процептивну поведінку, а відсоток тварин з наявністю такої поведінки у групі дає додаткову її кількісну характеристику [4].

Рецептивну поведінку оцінюють за кількістю лордозних реакцій (прийняття пози готовності до спарювання – вигинання спини) у кожної самки та за її відсотком у групах тварин. Також розраховують коефіцієнт лордозу, тобто відсоток лордозних реакцій відносно загальної кількості садок у самця.

Для тестування наявності чоловічої статевої поведінки до піддослідної самки підсаджують на 10–15 хв рецептивно активну інтактну самку в стадії еструсу. Спостерігають за наближенням тварини до рецептивної самки, обнюхування нею статевих органів, що є проявом чоловічої процептивної поведінки, а також відмічають кількість садок, що характеризує чоловічу копулятивну поведінку. Підраховують достовірність різниці між відсотком самок, що виявляють чоловічу статеву поведінку у піддослідних і контрольних групах. В подальшому ці тварини можуть бути використані для вивчення плодючості. В дослідях на оварієктомованих тваринах через 2 тижні після операції щурам підшкірно вводять з інтервалом у 48 год 5 мкг естрадіолу бензоату чи естрадіолу в олійному розчині і 500 мкг прогестерону (олійний розчин). Тестування процептивної та рецептивної статевої поведінки проводять за описаною вище схемою.

Для оцінки плодючості самок підсаджують до нормальних активних самців у співвідношенні 2:1 строком на 10–12 діб, після чого відсаджують. Спостерігають за наявністю та розвитком вагітності, а після пологів визначають кількість щурят, що народилися. Встановлюють відсоток вагітних самок від загальної їх кількості, парованих з самцями. Також підраховують число новонароджених на кожну матір.

## **2.2. Основні критерії порушень нейроендокринної регуляції репродуктивної функції у самців**

### **2.2.1. Морфологічна характеристика та функціональний стан органів статевої системи**

Порушення темпу статевого дозрівання може бути встановлене за змінами часу появи зрілих сперматозоїдів у придатках сім'яників ( в нормі на 43–46 добу).

Першим кроком в оцінці морфологічного стану статевої системи дорослих тварин є визначення маси (абсолютної та відносної) сім'яників та їх придатків, вентральної та передньої часток передміхурової залози, сім'яних пухирців. Один сім'яник та шматочки вентральної частки передміхурової залози фіксують у рідині Буена або Карнуа для гістологічного дослідження, а решту тканини, що залишилась, за винятком придатків сім'яників, заморожують при  $-20^{\circ}\text{C}$  і використовують для біохімічних аналізів.

Перш за все визначають функціональний стан і вміст сперматозоїдів у придатках сім'яників за загальноприйнятою методикою [5]. Підраховують концентрацію статевих клітин у 2 мл ізотопічного розчину, в який виливають вміст розрізаного вдовж епідидимісу. Суспензію сперматозоїдів використовують для виявлення характеру та тривалості руху клітин, відносної кількості живих сперматозоїдів та їх патологічних форм. Детальну характеристику сперматогенезу отримують шляхом мікроскопічного вивчення зрізів сім'яників за такими показниками, як: індекс сперматогенезу з урахуванням його стадій, сумарну кількість нормальних сперматогоній і число дегенеративних форм, кількість каналців із злушенням сім'яродним епітелієм та відносну кількість каналців у метафазі II поділу дозрівання [2].

Окрім сім'яних каналців, гістологічному вивченню підлягають розташовані між ними клітини Лейдига, в яких утворюються андрогени. При гістологічному вивченні передньої частки передміхурової залози особливу увагу звертають на величину просвіту кінцевих відділів секреторних залоз, співвідношення площин зайнятої сполучною тканиною та залозистими структурами, стан залозистого епітелію, а саме: товщину епітеліального шару (форму та висоту епітеліальних клітин), наявність деструктивних чи атрофічних змін. Саме стан залозистого епітелію корелює з рівнем андрогенних гормонів в організмі, який, в свою чергу, регулюється гонадотропними гормонами гіпофіза.

Морфологічну характеристику передміхурової залози рекомендується доповнювати такими андрогензалежними показниками, як вміст в ній ДНК, РНК і білка. Чітку залежність від андрогенів виявляють також вміст фруктози в передній частині передміхурової залози (коагуляційна залоза), а також ДНК, РНК та білка в сім'яних пухирцях.

Результати вивчення морфологічного і функціонального стану сім'яників і додаткових статевих залоз співставляють з даними визначення концентрації тестостерону (Т) в плазмі крові за допомогою радіоімунологічного та імуноферментного методів.

Так само, як в дослідженнях на самках, аналіз результатів досліджень на самцях потребує диференціації первинних гонадотоксичних уражень від таких, що пов'язані з розладами нейроендокринної регуляції. Тому необхідно оцінювати гонадотропну активність гіпофіза – загальну у його гомогенатах або за вмістом ЛГ, а, за наявності технічних можливостей, і ФСГ у плазмі крові. Односпрямовані зміни вмісту гонадотропінів і Т є ознакою вторинного (центрального) походження змін за всіма описаними вище показниками.

### **2.2.2. Оцінка регуляції секреції гонадотропних гормонів**

Порушення секреції гонадотропінів за механізмом негативного зворотного зв'язку у самців оцінюють за ступенем компенсаторної гіпертрофії сім'яника при гемікастрації або за



ступенем підвищення рівня ЛГ у плазмі крові чи сумарної гонадотропної активності гомогенатів аденогіпофіза після тотальної (двосторонньої) кастрації через 5–7 діб після операції.

Для вивчення чутливості гіпоталамо-гіпофізарної системи до андрогенів за механізмом негативних зворотних зв'язків можна рекомендувати пробу з нестероїдним антиандрогеном – флутамідом (ніфтолід, флуцином, фругіл). Принцип дії цього антиандрогену полягає в тому, що він, блокуючи рецептори андрогенів в тканинах-мішенях, послаблює вплив циркулюючих андрогенів на утворення ЛГ-РГ та секрецію гонадотропнів.

Дослідження проводять на статевозрілих самцях. До введення антиандрогену у піддослідних та контрольних щурів з під'язикової вени забирають кров для визначення фонового рівня гормонів (ЛГ і Т). Піддослідним і контрольним тваринам перорально двічі з інтервалом 12 год за допомогою металевого зонду у шлунок вводять антиандроген в дозі 25 мг/кг маси тіла на добу протягом 3-х діб (усього 6 разів). Вранці наступного дня після закінчення введення препарату повторно беруть кров для визначення вмісту гормонів – Т і ЛГ. Якщо виникають труднощі у визначенні ЛГ, можна обмежитись вимірюванням вмісту Т.

В багатьох випадках порушення СДМ у самців, які виникають внаслідок негативного впливу фармакологічних препаратів у пренатальному або ранньому постнатальному періодах розвитку, пов'язані з демаскулізацією та/або фемінізацією гіпоталамічних центрів регуляції гонадотропної функції гіпофіза. У таких тварин зберігається здатність гіпоталамуса викликати під впливом екзогенних естрогенів овуляторний викид ЛГ з гіпофіза за механізмом позитивного зворотного зв'язку.

Підходи до оцінки порушень регуляції секреції ЛГ за механізмом позитивного зворотного зв'язку у самців щурів подібні до таких, які використовують у дослідах на самках (див. вище п. 2.1.2). Дослідження виконують на кастрованих тваринах, яким одноразово вводять естрадіолу бензоат (I тест) або імплантують у передню камеру ока половинку яєчника статевонезрілої самки (II тест) (схеми тестів описано вище, п. 2.1.2). Подібно до самок, у самців при виконанні I тесту результати оцінюють за приростом рівня ЛГ у плазмі крові після введення естрадіолу бензоату в порівнянні з його базальним рівнем у піддослідних і контрольних тварин, в разі виконання II тесту – за наявністю справжніх жовтих тіл в імплантованому яєчнику.

Необхідним елементом при оцінці порушень нейроендокринної регуляції секреції ЛГ є визначення чутливості гонадотропоцитів аденогіпофіза до гіпоталамічного ЛГ-РГ. Схема проведення цього тесту та оцінка результатів описана в п. 2.1.2.

### *2.2.3. Статева поведінка та плодючість*

Загальні умови спостереження статевої активності щурів викладено у п. 2.1.3. Самця підсаджують у клітку до рецептивної самки на 10–15 хв. Сексуальне збудження самця виявляється у вигляді підвищення рухової активності, наближення до самки, обнюхування зони геніталій та кількості садок (маунтинг). Латентність садки та постеякуляторний інтервал залежать від центральних нервових механізмів регуляції чоловічої статевої поведінки.

Щоб виявити гомосексуальну поведінку піддослідного самця, його підсаджують у клітку з сексуально активним самцем. При контакті з нормальними самцями вони приходять в стан сексуального збудження набагато частіше, ніж при контакті з самками. Латентний період садки зменшується, кількість садок зростає порівняно з контрольною групою тварин.

Статева поведінка за жіночим типом тестується на кастрованих самцях, яким проводять замісну гормональну терапію естрадіолу бензоатом та прогестероном за вищеописаною схемою (див. п. 2.1.3). Проявом фемінізації статевої поведінки у самців є посилення лордозних реакцій (прогини спини).

### **3. Дослідження впливу фармакологічних препаратів на ГГНС**

#### **3.1. Основні критерії порушень функціонального стану ГГНС в умовах фізіологічного спокою**

Інтегральним показником функціональної активності ГГНС в умовах фізіологічного спокою вважають рівень глюкокортикоїдних гормонів у крові. В досліджах на щурах найбільш доступним методом для реалізації цієї мети є вимірювання концентрації 11-гідроксикортикостероїдів (11-ГКС) у плазмі крові за допомогою флюориметрії [6]. Даним мікрометодом визначається сумарний вміст кортикостерону і кортизолу. У щурів 11-ГКС представлені майже виключно кортикостероном. Останній може бути визначений з великою точністю імуноферментним чи радіоімунним методами.

Якщо є можливість визначити концентрацію адренкортикотропного гормону (АКТГ) у плазмі крові імуноферментним чи радіоімунним методами, це може надати важливу інформацію про первинний чи вторинний (нейроендокринний) механізм виявлених змін. Це також може бути встановлено методом виключення – за результатами вивчення чутливості кори надниркових залоз до АКТГ.

#### **3.2. Вивчення чутливості кори надниркових залоз до АКТГ**

Стимуляцію препаратами природного чи синтетичного АКТГ або його фрагментів (наприклад, синактенон) проводять в досліджах *in vivo* чи *in vitro* (на зрізах інкубованих надниркових залоз). У щурів рекомендується брати кров для визначення вмісту 11-ГКС через 15–30 хв після внутрішньовенного введення стимулюючої дози препарату (наприклад, 2–5 МО АКТГ/кг маси тіла). При проведенні експериментів *in vitro* вміст 11-ГКС, що утворюються за час інкубації (1–1,5 год), визначають в гомогенатах інкубованих зрізів надниркової залози разом із інкубаційною рідиною.

#### **3.3. Реакція ГГНС на гострий стрес**

Ушкодження ГГНС, що їх викликають фармакологічні препарати під час вагітності, нерідко можуть виявлятися в умовах функціонального напруження, спричиненого стресовими стимулами. Для тестування стрес-реактивності ГГНС можна використовувати різні види стресу – іммобілізаційні, комбіновані (подразнення електричним струмом, світлом, звуком), фізичні навантаження (примусовий біг, плавання) та інші. Для прикладу наводимо схему стандартного тесту з іммобілізаційним стресом у щурів. Піддослідних і контрольних тварин розподіляють на 2 групи, одна з яких призначена для визначення базального рівня 11-ГКС, друга – для визначення вмісту 11-ГКС після іммобілізації. Тварин прив'язують за ланки до дерев'яної дощечки в положенні на спині строком на 1 год, після чого швидко декапітують. Водночас декапітують тварин, яких не піддавали іммобілізації. Кров, що витікає з шийних судин, збирають у гепаринізовані пробірки, відокремлюють сироватку чи плазму і визначають у ній вміст 11-ГКС або кортикостерону. В разі, коли поряд з глюкокортикоїдами планується вимірювати вміст АКТГ, замість гепарину використовують ЕДТА згідно з інструкцією, яка додається окремо. Зразки плазми зберігають при  $-20^{\circ}\text{C}$ . Стрес-реактивність ГГНС оцінюють за зростанням рівня гормонів у плазмі крові. В разі, якщо дослідження проведено з визначенням 11-ГКС чи кортикостерону, правильно проаналізувати результати тесту допомагають дані експериментів із стимуляцією екзогенним АКТГ (див. вище п. 3.2.).

### 3.4. Дексаметазоновий тест

Для вивчення нейроендокринної регуляції кори надниркових залоз за механізмом негативного зворотного зв'язку у щурів рекомендується проводити дексаметазоновий тест. Його принцип полягає у пригніченні глюкокортикоїдами нейроендокринних центрів мозку, які опосередковують їх гальмівну дію на секрецію АКТГ. Тварин розподіляють на відповідні групи та підгрупи (див. п. 3.3). Одній підгрупі щурів вводять фізіологічний розчин, іншій – внутрішньоочеревинно або під шкіру дексаметазон в дозі 25 мкг/100 г маси тіла. Через 4 год тварин декапітують, збирають кров для визначення в ній базального рівня 11-ГКС. Порівнюють ступінь зменшення базальної концентрації 11-ГКС у плазмі крові у піддослідних і контрольних тварин.

## 4. Поглиблені дослідження СДМ та стану ГГНС

Поглиблені дослідження проводяться для одержання додаткових даних про механізми ушкоджуючого впливу фармакологічних препаратів на розвиток нейроендокринної системи плоду. Стосовно репродуктивної системи приділяють увагу порушенням СДМ. Деякі нейрохімічні і метаболічні маркери цих розладів, наприклад, вміст та обіг біогенних моноамінів, ароматизація та 5 $\alpha$ -відновлення андрогенів у мозку більш чітко виявляються у тварин 10-денного віку, аніж у дорослих, інші, такі як нейроморфометричні показники – у статевозрілих тварин.

Додаткову інформацію про функціональний стан ГГНС дає електронномікроскопічне вивчення ультраструктури аденогіпофіза за умов гострого стресу та реакції ГГНС на центральну стимуляцію норадреналіном (НА). Ці дослідження виконують на статевозрілих тваринах.

### 4.1. Нейроморфометричні дослідження

Метою нейроморфометричних досліджень є вивчення морфологічних проявів можливих порушень СДМ. Дослідженню підлягають так звані «секс-диморфні ядра» преоптико-передньогіпоталамічної ділянки мозку, а саме: супрахіазматичне (СХЯ) та медіально-преоптичне (МПЯ) ядра [7].

Для гістологічного аналізу гіпоталамічну ділянку мозку фіксують у рідині Буена. Парафінові серійні фронтальні зрізи фарбують крезоловим фіолетовим. За допомогою окуляр-мікрометра АМ-9-2 вимірюють два взаємо-перпендикулярні діаметри ядер нейронів і розраховують їх об'єм за формулою:

$$V = \frac{\pi}{6} Dd^2$$

де  $d$  – менший, а  $D$  – більший діаметри ядер нейронів.

При демаскулізації мозку у самців щурів 10-денного віку спостерігається зменшення об'єму ядер нейронів СХЯ та МПЯ та змінюється їх частотний розподіл, внаслідок чого у щурів зменшуються або зовсім зникають статеві розбіжності цих показників. У дорослих статевозрілих щурів ці зміни зазвичай більш виражені, ніж у статевонезрілих тварин.

### 4.2. Вміст та обіг катехоламінів

Вивчення нейрохімічних проявів можливих порушень СДМ проводять на 10-денних та статевозрілих (3–6 міс) щурах. Дослідженню підлягають цілий гіпоталамус, преоптична ділянка (ПД) та медіобазальний гіпоталамус (МБГ), які причетні до регуляції репродуктивної системи.

Після декапітації у піддослідних і контрольних щурів на холоді (+4°C) виділяють необхідні для аналізу структури головного мозку. В разі проведення експерименту на тваринах 10-ден-

ного віку ці структури об'єднують від 3–4 щуренят відповідної статі. Одержані зразки тканини гомогенізують в охолодженому розчині 0,01 н соляної кислоти з паралельною екстракцією н-бутанолом. Визначення норадреналіну (НА) і дофаміну (ДА) проводять методом диференціальної спектрофлюориметрії [8]. Вміст моноамінів виражають у нмолях/г сирової тканини.

Швидкість обігу НА і ДА у мозку досліджують за допомогою інгібітора синтезу катехоламінів ( $\alpha$ -метил-пара-тирозину, МПТ), який вводять одноразово під шкіру в дозі 250 мкг вільної основи/кг маси тіла за 1 або 2 год до декапітації тварин. Швидкість обігу моноамінів розраховують на підставі визначення їх вмісту до та після введення МПТ [9] і виражають в нмоль/г/год.

Порушення СДМ у напрямку демаскулізації та/або фемінізації у самців щурів 10-денного віку виявляються у підвищенні вмісту і, відповідно, зменшенні швидкості обігу НА у ПД. У разі дефемінізації та/або маскулізації мозку у самок щурів 10-денного віку спостерігається зростання вмісту НА і ДА у МБГ. В обох випадках ці зміни нівелюють статеві відмінності вмісту та обігу моноамінів, які притаманні інтактним тваринам того ж віку. Проявом маскулізації мозку у дорослих самок є зменшення вмісту НА і ДА у гіпоталамусі.

### **4.3. Функціональний метаболізм андрогенів**

Дослідження рекомендується проводити на щурах 10-денного віку. Вивчення активності ферментів ароматазного комплексу і 5 $\alpha$ -редуктази C<sub>19</sub>-стероїдів у дискретних структурах мозку проводять за модифікованим [10] методом McLucky et al. [11]. Цей метод полягає у розділенні у тонкому шарі силікагелю та наступній радіометрії продуктів реакції, що утворилися внаслідок інкубування надосадової фракції 10%-ного гомогенату тканини з міченим тритієм Т ([1,2,6,7-<sup>3</sup>H]-Т). Активність ароматази виражають в пмоль естрадіолу, а 5 $\alpha$ -редуктази – в пмоль 5 $\alpha$ -відновлених метаболітів Т (5 $\alpha$ -дигідротестостерону та 5 $\alpha$ -андростан-3 $\alpha$ , 17 $\beta$ -діолу), утворених протягом 1 год у перерахунок на 1 г сирової тканини або 1 г білка.

Порушення СДМ виявляються у зменшенні ароматизації Т в ПД та підвищенні 5 $\alpha$ -редуктазної активності в ПД та МБГ самців.

### **4.4. Норадренергічна реактивність**

Дослідження норадренергічної реактивності ГГНС проводять на статевозрілих щурах. Якщо експерименти виконуються на самках, треба враховувати стадію естрального циклу.

За 8 діб до експерименту наркотизованим піддослідним і контрольним тваринам під стереотаксичним контролем імплантують у латеральний або 3-й шлуночки мозку канюлю [12]. За 12 год до експерименту щурів залишають без їжі. Наркотизованим тваринам у шлуночок вводять норадреналіну бітарtrat (10 мкг у 2 мкл 0,9% апірогенного ізотонічного розчину натрію хлориду). Відповідній контрольній підгрупі тварин вводять розчинник. Через 30 хв тварин швидко декапітують, збирають кров у гепаринізовані центрифужні пробірки, відокремлюють плазму для визначення в ній вмісту 11-ГКС. Динаміку змін рівня 11-ГКС у плазмі крові після стимуляції НА можна спостерігати протягом 90 хв після його введення, використовуючи для взяття зразків крові техніку катетеризації зовнішньої яремної вени [13]. Ступінь підвищення рівня 11-ГКС у крові є інтегральним показником норадренергічної реактивності ГГНС.

### **4.5. Електронномікроскопічне дослідження кортикотропоцитів аденогіпофіза**

Аденогіпофіз виділяють під час забою тварин, розрізають на шматочки, фіксують глутаральдегідом і чотириокисом осмію, зневоднюють в етанолі зростаючої концентрації і заливають в епон-812. Після ультрамікромії і фарбування уранілацетатом і цитратом свинцю препарати переглядають в електронному мікроскопі ІЕМ-100С (Японія).

У разі послаблення стрес-реактивності аденогіпофіза спостерігається зниження розмірів кортикотропоцитів та накопичення в них гранул нейросекрету, зменшення кількості елементів зернистої ендоплазматичної сітки, а також поява в цитоплазмі великих ліпідних краплин.

### Література

1. Резников А.Г. Половые гормоны и дифференциация мозга.— К.: Наук. думка, 1982.— 252 с.
2. Бариляк І.Р., Неумержицька Л.В., Бишовець Т.Ф., Даниленко В.С. Вивчення гонадотоксичної дії нових лікарських засобів та їх впливу на репродуктивну функцію тварин: Метод. рекомендації.— К., 2000.— 24 с.
3. Baraghini C.F., Celani M.F., Zaidi A. A. et al. Problems associated with the in vitro bioassay of serum luteinizing hormone (LH) on mouse Leyding cell preparations: methodological aspects//J. Endocr. Invest.— 1984.— V.7 (Suppl.3)— P. 23–31.
4. Гладкова А.И., Карпенко Н.А. Гормональная коррекция половой невосприимчивости овариэктомированных крыс//Пат. физиол. exper. терапия.— 1986.— №2.— С. 58–61.
5. Милованов В.К. Биология воспроизведения и искусственного осеменения у животных.— М.: Изд-во с/х литературы, журн. и плакатов, 1962.— С. 696–701.
6. Балашов Ю.Г. Флюориметрический микрометод определения кортикостерона: сравнение с другими методами//Физиол. журн. СССР.— 1990.— Т.76, №2.— С. 280–283.
7. Swanson H.H., Houtsmuller E.J., Diaz R. et al. The preoptic area and sexual differentiation//Hormones, Brain and Behaviour in Vertebrates. Sexual Differentiation, Neuroanatomical Aspects, Neurotransmitters and Neuropeptides/J.Balthazatt (ed).— Basel: Karger, 1990.— V.8.— P. 30–40.
8. Jacobowitz D., Richardson J. Method for the rapid determination of norepinephrine, dopamine and serotonin in the same brain region//Pharmac. Biochem. Behav.— 1978.— V.8.— P. 515–519.
9. Brodie B., Costa E., Dlabac A. et al. Application of steady state kinetics to the estimation of synthesis rate and turnover time of tissue catecholamine//J. Pharmac. Exp. Ther.— 1966.— V.154.— P. 493–498.
10. Резников А.Г., Акмаев И.Т., Фиделина О.В. и др. Метаболизм тестостерона в дискретных областях мозга плодов крыс//Пробл. эндокринолог.— 1990.— Т.36, №3.— С. 57–61.
11. McLusky N.J., Philip A., Hulburt C., Naftolin F. Estrogen formation in the developing rat brain: sex differences in aromatase activity during early postnatal life//Psychoneuroendocrinol.— 1985.— V.77.— P. 355–361.
12. Antunes-Rodrigues J., McCann S.M. Chemical stimulation of water sodium chloride and for intake by injection of cholinergic and adrenergic drugs into the third brain ventricle//Proc. Soc. Exp. Biol. Med.— 1970.— V.133.— P. 1464–1470.
13. Harms P., Ojeda S. A rapid and simple procedure for chronic cannulation of the rat jugular vein//J. Appl. Physiol.— 1974.— V.36.— P. 391–392.

## ОЦІНКА МУТАГЕННИХ ВЛАСТИВОСТЕЙ НОВИХ ЛІКАРСЬКИХ ЗАСОБІВ

Бариляк І.Р.,  
Неумержицька Л.В.,  
Дуган О.М.,  
Кривошеїн Ю.С.,  
Порошенко Г.Г.,  
Логодир Т.А.

### Вступ

Проблеми хімічного мутагенезу привертають увагу в зв'язку із значним збільшенням у зовнішньому середовищі вмісту хімічних сполук, серед яких немало частку становлять речовини, яким властива мутагенна дія.

Дія хімічних мутагенів на спадковий апарат людини призводить до збільшення частоти народження дітей з різними спадковими захворюваннями або до розвитку у нинішнього покоління злоякісних пухлин. Особлива небезпека мутагенних сполук полягає у тому, що вони можуть викликати значне збільшення кількості рецесивних мутацій, які ведуть до тяжких спадкових захворювань. Такі мутації не виявляються в першому поколінні, але поступово нагромаджуються, можуть через декілька поколінь викликати сплеск генетичної захворюваності [1].

Питання хімічного мутагенезу (спричиненого в тому числі й лікарськими засобами) інтенсивно вивчають в багатьох лабораторіях різних країн світу. Кількість таких досліджень швидко зростає і відповідно збільшується кількість сполук з описаною мутагенною дією.

Для оцінки мутагенних властивостей хімічних сполук запропоновано майже 100 різноманітних тест-систем, багато з яких досить широко застосовуються. Проте до сьогодення немає універсальної тест-системи, яка могла б виявити всі основні типи генетичних ушкоджень. Це призводить до необхідності використання цілого набору тест-об'єктів від бактеріофагів та вірусів до ссавців та клітин людини в умовах *in vitro* [2].

Останніми роками чимало зроблено для оцінки відповідності запропонованих методів дослідження мутагенного потенціалу хімічних сполук (ступінь опрацювання, масштаб застосування, швидкість виконання, вартість та можливість впровадження у практику роботи лабораторій негенетичного профілю (токсикологічного, гігієнічного).

Широке визнання дослідників отримали такі методи:

- 1) тест Еймса *Salmonella*/мікросоми та різні його модифікації;
- 2) оцінка аберацій хромосом та сестринських хроматидних обмінів у клітинах ссавців та людини *in vitro* та *in vivo*;
- 3) визначення однострункових розривів ДНК;
- 4) оцінка частоти генних мутацій в культурах клітин різного походження.

Останнім часом почали застосовуватися сучасні технології, які дають можливість підвищити ефективність оцінки змін хромосомного апарату при дії ушкоджуючих чинників (метод флуоресцентної гібридизації *in situ*) метафазних хромосом людини та експериментальних тварин з ДНК зондами (FISH).

Крім того, все більше значення надається оцінці можливих порушень механізмів репарації нуклеїнових кислот при індукованому мутагенезі.

Хімічні речовини можуть індукувати генні, хромосомні та геномні мутації та мати щодо них високу специфічність. Таким чином, при оцінці мутагенного потенціалу речовин використовується низка методів, які дозволяють реєструвати всі типи генетичних змін. Комбінація цих методів повинна бути максимально інформативною та одночасно досить економною для забезпечення реальності виконання програми випробувань. З іншого боку, перелік методів, схеми випробувань, аналізу та оцінки експериментальних даних повинні бути затвердженими відповідними державними органами для забезпечення уніфікації та офіційного характеру результатів оцінки мутагенності [3].

Стандартна схема таких випробувань включає, як мінімум:

- 1) облік генних мутацій на мікроорганізмах (тест Еймса) чи на дрозофілі;
- 2) облік домінантних летальних мутацій в зародкових клітинах гризунів (мишей, щурів);
- 3) облік хромосомних аберацій у клітинах кісткового мозку лабораторних тварин;
- 4) облік хромосомних аберацій або сестринських хроматидних обмінів у культурі лімфоцитів людини.

Їх спільною рисою є те, що методи, які використовуються, дозволяють поетапно вирішувати дві задачі: виявити потенційні мутагени (методика Еймса) та оцінити їх генетичну активність.

Для визначення мутагенної активності лікарських препаратів в Україні пропонується використовувати перші три з наведених тестів.

При цьому слід враховувати, що ще у 1972 році науковими експертами ВООЗ найбільш адекватними методами оцінки генотоксичності фармакологічних препаратів визнано цитогенетичні дослідження на тваринах, і навіть культура лімфоцитів периферичної крові людини повинна розглядатися як допоміжний метод, який дає можливість оцінити лише деякі аспекти механізму дії тієї чи іншої сполуки.

## Послідовність оцінки мутагенності фармакологічних препаратів

Враховуючи широкий спектр тест-систем, які використовуються для оцінки мутагенності фармакологічних препаратів, важливо визначити їх пріоритетність. З метою виявлення мутагенності досліджуваних препаратів необхідно керуватися двоетапністю таких дослідів.

**I етап** – попередня оцінка мутагенної активності. Основними методами є аналіз даних літератури, напівкількісний метод обліку мутацій на мікроорганізмах (тест Еймса) та мікроядерний тест на клітинах кісткового мозку лабораторних тварин. Додаткові методи: аналіз аберацій хромосом в культурі лімфоцитів людини, аналіз сестринських хроматидних обмінів в клітинах людини.

**II етап** – кінцева кількісна оцінка мутагенної активності фармакологічних препаратів. Основні методи: метафазний аналіз аберацій хромосом в клітинах кісткового мозку ссавців (або в клітинах зародків тварин на постімплантаційних стадіях розвитку) та облік домінантних летальних мутацій у самців лабораторних тварин. Додаткові методи: анателофазний аналіз аберацій хромосом в клітинах кісткового мозку, транслокаційний тест та облік хромосомних порушень в сперматоцитах.

### 1. Напівкількісний метод обліку генних мутацій, тест Еймса *Salmonella/microsome*

Суть методу полягає в реєстрації здатності препарату та його метаболітів індукувати генні мутації у мікроорганізмів в системі метаболічної активації *in vitro* [4,5]. Індикаторні бактерії разом з препаратом, який випробується, печінкою щурів та кофакторами (НАДФ, глюкозо-6-

фосфат) вносять на чашки Петрі в шар верхнього напіврідкого агару. Під впливом ферментів, які містяться в гомогенаті печінки, в результаті функціонування системи мікосомального окислення препарат може зазнавати метаболічні перетворення. Вихідна речовина та її метаболіти можуть індукувати мутації у мікроорганізмів.

**Індикаторні штами.** В експериментах рекомендується використовувати гістидинзалежні штами *Salmonella typhimurium* TA 98 (виявляють мутагени, які спричиняють мутації типу зсуву рамки зчитування генетичного коду) та TA 100 (виявляє мутагени, які викликають мутації типу заміни пар основ). Ці штами несуть мутації аутоксотрофності за гістидином. Наявність мутагенного ефекту у досліджуваного препарату враховується за індукцією зворотних мутацій від аутоксотрофності за гістидином до прототрофності. Використання цього набору штамів дозволяє ресструвати як факт індукції мутації, так і молекулярний механізм дії мутагенів.

**Зберігання бактеріальних культур.** Бактеріальні культури зберігаються в шарі напіврідкого агару (0,6%) під шаром вазелінової олії з додаванням 25 мл розчину ампіциліну (ці тест-штами – плазмідмісткі). Для роботи бактеріальна культура пересівається з 2% м'ясопептонним агаром (МПА). Для приготування вихідної робочої суспензії мікроорганізмів культуру пересівають у відповідну кількість м'ясопептонного бульйону (МПБ). Через певні проміжки часу (один раз на 2–3 місяці) при пересівах тест-штами перевіряють на відповідність їх генотипу.

### **Поживні середовища та розчини:**

МПА, 1,5% – використовується як нижній шар поживного агару (повноцінне середовище).

МПА, 2% – використовується для приготування пробірок із «скошеним» агаром при зберіганні бактеріальних культур.

МПА, 0,6% – використовується для зберігання бактеріальних культур, а також як верхній напіврідкий агар у методиці виявлення мутагенів.

Водний агар, 2% – 20 г агар-агару на 1000 мл дистильованої води, використовується як основа селективного агару.

Сольовий концентрат (буфер): цитрат натрію 3-заміщений – 2 г,  $K_2HPO_4 \cdot 3H_2O$  – 42 г,  $KH_2PO_4$  – 18 г,  $(NH_4)_2SO_4$  – 4 г, вода дистильована – до 1000 мл, рН – 7,2, автоклавувати при 1 атм 20 хв.

Розчин глюкози 20%, автоклавувати при 0,5 атм 20 хв.

Розчин L-гістидину солянокислого: 600 мкг/мл.

Розчин біотину: 300 мкг/мл.

Напіврідкий агар, 0,6% (мінімальний): агар «Difco» – 6 г, NaCl – 6 г, дистильована вода до 1000 мл, автоклавувати при 0,5 атм 20 хв.

Селективний агар: водний агар – 300 мл, сольовий концентрат – 100 мл, 20% розчин глюкози – 10 мл, 2% розчин  $MgSO_4 \cdot 3H_2O$  – 2 мл.

Напіврідкий напівзбагачений агар: до 200 мл напіврідкого 0,6% агару додати по 3,3 мл L-гістидину та біотину. Ці добавки забезпечують декілька генерацій клітин. Це необхідно тому, що ряд сполук індукуює мутації, здатні виявлятися в процесі реплікації ДНК з первинними пошкодженнями.

0,2 М фосфатний буфер, рН – 7,4: готують окремо розчини 27,2 г  $KH_2PO_4$  та  $K_2HPO_4 \cdot 3H_2O$  в 500 мл води. Змішують 81 мл розчину  $KH_2PO_4$  та 19 мл  $K_2HPO_4 \cdot 3H_2O$ . Об'єм буфера доводять до 200 мл.

Розчин 0,15 М KCl. Автоклавувати при 1 атм 20 хв.

Розчин KCl та  $MgCl_2 \cdot 6H_2O$ ,  $MgCl_2 \cdot 6H_2O$  6,5 г та 9,8 г KCl на 100 мл води.

Розчин натрієвої солі глюкозо-6-фосфату, 50 мл; готують безпосередньо перед створенням мікосомальної активуючої суміші.

**Перевірка генотипів штамів-тестерів.** При перевірці генотипів тестерних штамів необхідно підтвердити:



- а) наявність мутацій *his*-, *bio*- та *rfa*-мутацій;
  - б) наявність плазмиди *pkm-101*;
  - в) рівень спонтанного фону мутацій;
  - г) здатність тест-організму реагувати на відомий мутаген (чутливість штаму).
- Перевірку генотипів проводять згідно з [5].

**Підготовка тварин.** В експериментах використовуються самці щурів Вістар масою 180–220 г. Індукцію мікросомальних ферментів проводять триразовим внутрішньоочеревинним введенням 80 мг/мл фенобарбіталу (замість фенобарбіталу можна використати метилхолантрен, савол). За добу до декапітації тварин позбавляють їжі.

**Приготування S-9 фракції.** Щурів декапітують. Розтинають очеревину, витягують і зважують печінку, промивають холодним розчином 0,15М КСІ до повного видалення крові, подрібнюють та гомогенізують у розчині КСІ (3 мл розчину на 1 г печінки). Гомогенат центрифугують протягом 20 хв на холоді при 9000g на центрифугі VAK-601. Надосадову рідину (S-9 фракцію) зберігають при -50°C у камері глибокого заморожування та розморожують безпосередньо перед дослідженням. Всі операції з виділення S-9 фракції проводять стерильно.

**Калібрування Spectromom-401.** Однією з основних умов успішної оцінки мутагенності в бактеріальних тест-системах є однакова щільність мікробної суспензії, яка вноситься. При перевірці щільності бактеріальної суспензії за стандартною шкалою мутності помилка може становити порядок величини. Штами Еймса досягають початку стаціонарної фази росту (в цій фазі мікробні клітини найактивніші) через 2,5–3 год культивування в термостаті при струшуванні, проте, вплив різних умов (режим аерації, початкова температура МПБ, вік мікробної культури) може прискорювати або сповільнювати розмноження бактеріальних клітин [6]. Для перевірки щільності бактерій (кількості мікроорганізмів в 1 мл бульйону) використовується Spectromom-401 (або будь-який фотоелектроколориметр), що дозволяє з великою точністю визначати кількість мікробних клітин в одиниці об'єму рідини. Прилад попередньо калібрується (будується калібровочна крива). Через 1,5 години культивування в термостаті при аерації відбирають проби бактеріальної бульйонної культури, вимірюють мутність та 0,25 мл висівають на МПА. Подібна операція проводиться через кожні 15 хвилин (з наступним розведенням суспензії), відбір проб припиняється через 3,5 години. За добу підраховують кількість колоній, які виростили в термостаті, та будують графік залежності кількості мікроорганізмів в 1 мл бульйону від часу культивування. Ця залежність є еталоном при визначенні бактеріальної щільності в будь-який момент від початку вирощування мікробних клітин.

**Приготування бактеріальної суспензії.** 18-годинну («нічну») бульйонну культуру *Salmonella typhimurium* вносять в МПА з розрахунку 1 мл культури на 20 мл бульйону з ампіциліном (0,1 мл ампіциліну на 200 мл бульйону) та вирощують в термостаті до щільності 2–3·10<sup>3</sup> клітин/мл при аерації на струшувачі АБУ-1. Суспензію центрифугують при 5000 об./хв протягом 15 хвилин. Осад відмивають від бульйону 30–40 мл 0,2 М фосфатного буферу та знову центрифугують. Надосадову рідину зливають, осад ресуспендують до щільності 2·10<sup>9</sup> клітин/мл в 0,2 М буфері (тобто в об'ємі буферу, в 10 разів меншому, ніж при прощуванні). Ця суспензія бактерій є робочою.

**Приготування мікросомальної активуючої суміші (МС+).** Суміш готують за кілька хвилин до початку експерименту, на холоді, стерильно, з розрахунку на 1 мл: 0,3 мл S-9 фракції, 4 мМ НАДФ, 5 мМ глюкозо-6-фосфату, 33 мМ КСІ, 8 мМ MgCl<sub>2</sub> та 0,2 М фосфатний буфер до 1 мл. Об'єми, які вносяться в активну суміш S-9 фракції, відповідають кількості мікросомального білку, оптимальній для тестування більшості груп хімічних сполук [4].

При приготуванні МС- (варіант досліду без активації) замість глюкозо-6-фосфату та НАДФ в суміш додається аналогічна кількість стерильної бідистильованої води.

**Проведення експерименту.** В пробірку з 2,5 мл напіврідкого агару вносять 0,1 мл розчину досліджуваної речовини у відповідних концентраціях, 0,1 мл тест-організму, 0,5 мл МС+.

Вміст пробірки швидко перемішують та виливають на шар голодного (позбавленого гістидину) агару. Перелічені операції необхідно проводити протягом 15 секунд. Експеримент проводиться паралельно з повною (МС+) та неповною (МС-V) системою метаболічної активації.

Як стандартні позитивні контролю можна застосовувати:

- а) тіофосамід в дозі 200 мкг/чашку для тест-штаму ТА 100,
- б) 2,7-діаміно-4,9-діокси-5,10-діоксо-4,5,8,10-тетрагідро-5,9-діазопірен (ДДДТПД) в дозі 500 мкг/чашку для тест-штаму ТА 98 [4].

Для контролю ефективності функціонування системи метаболічної активації можна застосувати циклофосфат (для ТА 100) або бензидин (ТА 98) в дозі 200 мкг/чашку.

Необхідною умовою оцінки результатів експерименту є наявність мутагенного ефекту в усіх варіантах позитивних контролів. Перевищення кількості колоній-ревертантів у варіантах МС+ свідчить про ефективність функціонування системи мікосомального окислення. Всі агенти, що тестуються, вивчаються в діапазоні доз від 0,1 до 1000 мкг/чашку з кроком на порядок дози. На кожну концентрацію речовини використовують 3 чашки. Всі експерименти супроводжуються позитивними та негативними контролями. Облік результатів досліджень проводять через 48 годин інкубування в термостаті при 37°C шляхом підрахунку кількості ревертантних колоній в дослідних та контрольних варіантах.

Слід зазначити, що наведений метод є напівкількісним, оскільки враховує кількість селективних мутантів, а не частоту індукованих мутацій. За цим методом не визначається частка мутантних клітин по відношенню до кількості тих бактерій, які вижили після обробки препаратом. Проте дані про ступінь перевищення кількості ревертантних колоній в дослідних варіантах по відношенню до контролю, дозволяють виявити мутагенну активність досліджуваної речовини та охарактеризувати ступінь мутагенного ефекту в певній модифікації методу по відношенню до конкретного об'єкта.

### **1.1. Статистична обробка результатів оцінки мутагенності методом Еймса *Salmonella*/мікосому**

Основним завданням статистичної обробки даних, отриманих методом Еймса, є визначення значущості збільшення кількості ревертантних колоній в дослідних варіантах порівняно з контролем. Запропоновано різні методи аналізу результатів тесту Еймса. Найбільш придатним є метод множинних порівнянь Даннета [8]. Ефективність та раціональність цього методу стосовно методів попарного порівняння дослідних та контрольних варіантів виявляється у зниженні частоти хибно позитивних результатів, оскільки імовірність помилки приймається рівною 5%, в цьому методі можна задати для всього експерименту. Якщо експеримент складається тільки з двох варіантів (дослід та контроль), метод Даннета зводиться до звичайного критерію Стьюдента.

Метод передбачає оцінку випадкової дисперсії ( $\delta^2$ ) для всіх варіантів експерименту (окремо для варіантів з активацією та без неї для кожного штаму), що підвищує точність. Для стабілізації дисперсії показника передбачено попереднє логарифмування даних (кількість ревертантів). Слід відзначити, що такий підхід не передбачає використання в аналізі чашок Петрі, в яких отримано нульове значення кількості ревертантів. Такі ситуації реальні при роботі з речовинами, які мають бактерицидні властивості або виникають в результаті методичних помилок.

Обчислення здійснюють в такому порядку: логарифмування первинних даних, обчислення для кожного варіанту середніх значень, вибіркова оцінка випадкової дисперсії для усього експерименту та визначення ефекту за довірчим інтервалом для різниць середніх.

Алгоритм статистичної процедури полягає у наступному. Вводяться позначення:  $x_{ij}$  – кількість ревертантів у  $j$ -чашці Петрі на  $i$ -й дозі ( $i = 0, 1, 2, \dots, k$ ),  $k$  – кількість доз, які використовуються в експерименті (звичайно  $k = 5$ ),  $y_{ij} = \ln x_{ij}$ ,  $n_i$  – кількість чашок Петрі на  $i$ -ому варіанті досліджу.

Порядок обчислення:

1. Для кожного варіанту розраховують середні значення:

$$\bar{y}_i = \sum_{j=1}^{n_i} y_{ij} / n_i \quad \text{і} \quad x_i = e^{\bar{y}_i}$$

2. Розраховують вибіркочну оцінку випадкової дисперсії для усього експерименту:

$$\hat{\delta}_v^2 = \sum_{i=0}^k \cdot \sum_{j=1}^{n_i} (y_{ij} - \bar{y}_i)^2 / \sum_{i=0}^k (n_i - 1)$$

де  $v$  означає кількість ступенів свободи

$$v = \sum_{j=0}^k (n_i - 1)$$

3. Створюють довірчий інтервал для різниць середніх та роблять висновок про наявність ефекту, якщо

$$(\bar{y}_i - \bar{y}_0) - d_{kv}^{0,05} \hat{\delta}_v \left( \frac{n_0 + n_1}{n_0 n_1} \right)^{0,05} > 0$$

де індексом 0 відмічено контрольний варіант, а значення  $d_{kv}^{0,05}$  знаходять у додатку до таблиці Даннетта (табл. 1).

Розглянемо конкретний приклад. У таблицях 1 і 2 наведено приклад аналізу експерименту при проведенні робіт на одному з тест-штамів. У графі 1 таблиці 1 наведені значення дози сполуки, яка досліджується.

Усього в експерименті використано 5 доз і контроль (тобто  $k=5$ ) в умовах з метаболічною активацією (МС+) і без неї (МС-). У графах 2 і 4 зверху вказано значення кількості ревертантів на кожній чашці Петрі в кожному варіанті дослідження ( $x_{ij}$ ), знизу – відповідні значення логарифму кількості ревертантів ( $y_{ij}$ ). В графах 3 і 5 наведені середні значення показника, який тестується ( $y_i$ ) окремо для МС+ і МС-. В цьому експерименті кількість чашок Петрі однакова для усіх варіантів дослідження:  $n_i=3$  для усіх  $i$ .

У таблиці 2 в графах 2 і 3 наведено середні значення випадкових залишків, що визначаються як різниця між логарифмом ревертантів на даній чашці Петрі та середнім логарифмом для даного варіанту:  $d_{ij} = y_{ij} - \bar{y}_i$ .

Користуючись цією таблицею, легко розрахувати суму квадратів випадкових відхилень:

$$SS = \sum_{ij} d_{ij}^2$$

Результати підсумовуються по чашках Петрі для усіх варіантів експерименту, але окремо для МС+ і МС-. Одержуємо:

$$SS(\text{МС-}) = 1,64; \quad SS(\text{МС+}) = 1,79.$$

Відповідні числа ступенів свободи однакові:

$$v_{(\text{МС-})} = v_{(\text{МС+})} = \sum (n_i - 1) = 6 \cdot 2 = 12$$

Розділивши  $SS$  на значення  $v$ , отримуємо вибіркочну оцінку випадкової дисперсії:

$$\delta_{(\text{МС-})}^2 = SS_{(\text{МС-})} / v = 1,64 / 12 = 0,097 \quad \text{і} \quad \delta_{(\text{МС+})}^2 = SS_{(\text{МС+})} / v = 1,729 / 12 = 0,144$$

Тепер розраховуємо величину довірчого інтервалу для кожного варіанту дослідження. Для цього визначасмо:

$$\Delta_i = d_{kv}^{0,05} \hat{\delta}_v \left( \frac{n_0 + n_1}{n_0 n_1} \right)^{0,5}$$

знаходячи в таблиці Додатку 1, в якій наведені значення статистики Даннетта, що  $d_{5,12}^{0,05} = 2,50$ .

Тоді:

$$\Delta_{(\text{МС-})} = 2,50 (0,097(2/3))^{0,5} = 0,64 \quad \Delta_{(\text{МС+})} = 2,50 (0,144(2/3))^{0,5} = 0,77$$

Згодом перевіряємо за таблицею 1, чи перевищує середнє для яких-небудь варіантів досліду середнє контролю. Як видно з таблиці 1, тільки для дози 1000,0 мкг/чашку (МС-) середнє перевищує середнє в контролі більше, ніж на 0,77 (3,56–2,06–1,50). Отже, в цьому експерименті виявлено мутагенний ефект тільки в одному варіанті.

Було запропоновано [5] визначати ступінь мутагенного ефекту кратністю перевищення кількості колоній – ревертантів при даній дозі над такими в контролі. При відсутності статистично значущих відмінностей, ступінь мутагенного ефекту оцінюється знаком «-». При наявності статистично значущих відмінностей і перевищенні кількості колоній при даній дозі над контролем до 10 разів, мутагенний ефект оцінюється як слабкий («+»), від 10 до 100 – середній («++») і більше ніж у 100 разів – сильний («+++»).

Досвід практичної роботи показує, що більш раціональним є підхід [9], який передбачає, що незалежно від коливань дисперсії досліду, мутагенний ефект в тесті Еймса вважається встановленим при перевищенні кількості колоній-ревертантів в дослідних варіантах над контрольними для штаму ТА 1635 і ТА 1538 в 2,2 раза, для ТА 98 – 2 рази, для ТА 100 – в 1,8 раза. Слабкий, середній і сильний мутагенні ефекти оцінюються згідно з [5]. Такий підхід дозволяє уникнути хибних результатів і з більшою надійністю ідентифікувати мутагени.

## 2. Облік домінантних мутацій у статевих клітинах самців ссавців

Домінантні летальні мутації – генетичні зміни в статевих клітинах батьківських особин, які призводять до загибелі нащадків першого покоління на ембріональних стадіях розвитку. Основний внесок в індуковану домінантну летальність дають хромосомні мутації, менший – генні мутації. Мутагенний ефект виявляється в підвищенні ембріональної смертності нащадків першого покоління до і після імплантації.

**Лабораторні тварини.** Досліди звичайно проводяться на самцях білих нелінійних мишей, рідше – щурів. Для зниження генетично зумовленої варіабельності результатів пропонується використання лінійних мишей С57В1/6 або гібридів першого покоління СВАхС57В1/6 [2,6]. Для схрещення використовують самок з тієї ж партії.

**Методика і схема досліду.** Для прогнозу величин мутагенного ефекту хімічних речовин в досліді з індукції домінантних летальних мутацій тривалість експерименту повинна охоплювати усі стадії сперматогенезу, тобто 6 тижнів для мишей і 8 тижнів для щурів [2,6]. Речовину вводять зондом внутрішньощлунково 5 днів на тиждень. Контрольним тваринам вводять розчинник у тому ж об'ємі. Досліджуються 4 дози в інтервалі від 1/15 ЛД<sub>50</sub>. На кожну групу береться мінімум 15 самців. Після цього до кожного самця підсаджують по 3 віргінні самки на 1 тиждень.

Самок мишей і щурів розтинають на 17–18 і 19–20 день вагітності, відповідно. Підраховують кількість живих (ЖЕ) і мертвих (МЕ) ембріонів. Більша частина домінантних летальних ембріонів викликає загибель ембріонів під час імплантації або одразу після неї. Ембріони, що загинули на цій стадії, виглядають як темні гомогенні круглі потовщення діаметром 2,5–3,0 мм.

**Аналіз результатів і статистична обробка.** Враховують такі показники: кількість самок, % вагітних самок (фертильність), кількість імплантацій, живих і мертвих ембріонів на 1 вагітну самку, показник постімплантаційних втрат МЕ/(МЕ+ЖЕ). Основним показником домінантних летальних ембріонів є рівень постімплантаційних втрат. Порівняння цих показників в досліді і контролі проводять непараметричним методом (беручи за одиницю виміру показник постімплантаційних втрат на 1 самця, у якого є хоча б одна вагітна самка [2,3]) або згідно з [10].

Рівень постімплантаційної смертності зародків при оцінці результатів експериментів у кінці вагітності становить у щурів (6,4±0,2)%, у мишей – (9,3±0,8)% [2].

## 3. Метафазний аналіз аберацій хромосом у клітинах кісткового мозку ссавців

В основі методу лежить реєстрація структурних пошкоджень хромосом (хромосомних аберацій) в клітинах кісткового мозку на стадії метафази. Це дозволяє оцінювати цитогенетичну

активність (здатність викликати хромосомні мутації) хімічних речовин на соматичних клітинах ссавців.

**Лабораторні тварини.** Експерименти проводять на білих нелінійних мишах масою 18–20 г або щурах масою 180–200 г. Для проведення експериментів рекомендовано також використувати мишей лінії С57В1/6 [6] або гібридів першого покоління СВАхС57В1/6.

**Реактиви:**

а) розчин колхіцину в концентрації 2,5 мг/мл для дослідів на щурах і 0,25 мг/мл у дослідях на мишах;

б) розчин Хенкса;

в) фіксатор – суміш (льодяна оцтова кислота + метанол) 1:3 (готується перед фіксацією, зберігається в холодильнику);

г) гіпотонічний розчин (0,55%) хлористого калію;

д) азур-еозин для фарбування препаратів: 10 мл дистильованої води + 5 крапель 5% бікарбонату натрію + 2,0 мл 0,1% розчину еозину + 5,0 мл 0,1% розчину азуру (фарбу готують перед застосуванням);

е) фарба Унна-Блю (0,5 мл метиленовий синій + 0,5 толуїдиновий синій + 5,0 мл 75% етиловий спирт розчинюють у 100 мл 1%  $K_2CO_3$ . Кип'ять 2 хв на слабкому вогні, охолоджують, фільтрують.

**Методика.** За 2 години до евтаназії тваринам вводять внутрішньоочеревинно розчин колхіцину в об'ємі 0,1% від ваги тіла (при масі тіла щура 200 г – 0,2 мл колхіцину). Кінцева доза колхіцину 2,5 мг/кг. Тварин піддають евтаназії методом цервікальної дислокації. Виділяють і очищають стегнові кістки (для мишей дві, для щурів – одну). Ножицями зрізають епіфізи стегнових кісток. За допомогою шприца вимивають із кістки кістковий мозок підігрітим до 37°C (в термостаті) розчином Хенкса в центрифужну пробірку з тим же розчином. Суспензію клітин в розчині Хенкса можна зберігати в термостаті при 37°C до 2 годин.

Зразу після виділення кісткового мозку або зберігання в термостаті пробірки з суспензією центрифугують при 1000 об./хв 5 хвилин. Надосадову рідину відсмоктують. До осаду додають 3 мл підігрітого до 37°C гіпотонічного розчину хлористого калію і ресуспендують, а потім доливають гіпотонічний розчин до 7–8 мл. Пробірки поміщають в термостат при 37°C на 10 хвилин і знову центрифугують. Відсмоктують надосадову рідину, залишаючи 0,3 мл. Після ресуспендування до осаду додають 6–8 мл охолодженого фіксатора. Пробірки закривають, перемішують суспензію і ставлять у холодильник на 15–20 хвилин. Згодом суспензію знову центрифугують, відсмоктують надосадову рідину і додають 5–6 мл свіжого фіксатора. Зміну фіксатора проводять таким чином 2–3 рази.

Перед приготуванням препаратів суспензію центрифугують при 1000 об./хв протягом 5 хвилин. Відсмоктують надосадову рідину, залишаючи 1 мл. Осад ресуспендують пастерівською піпеткою. На знежирені, мокрі і охолоджені предметні скельця наносять 8–10 крапель суспензії. Фіксатор спалюють в полум'ї горілки. Скельця висушують на повітрі. Препарати фарбують розчином азур-еозину або заздалегідь приготовленою фарбою Унна-Блю промивають водопровідною водою і висушують на повітрі.

**Аналіз препаратів.** Аналіз препаратів проводять на мікроскопах під імерсійним об'єктивом. Збільшення 10х90. На кожну тварину аналізують 100 метафаз. Аналіз хромосомних аберацій проводять на шифрованих препаратах. Вимоги до відбору метафаз і класифікація типів аберацій викладені в методичних рекомендаціях [1]. Враховують такі показники: процент клітин з абераціями хромосом; кількість поодиноких фрагментів, хроматидних обмінів, парних фрагментів, хромосомних обмінів і загальну кількість аберацій на 100 метафаз. Прогалини («гепи») як аберації не реєструються. При наявності в клітині 10 і більше аберацій їх реєструють як клітини з множинними абераціями. Для аналізу мітотичної активності визначають мітотичний індекс, підраховуючи кількість мітозів на 1000 ядер.

Враховуючи досвід експериментальних досліджень, можна зробити висновок, що середня частота клітин з абераціями хромосом в кістковому мозку тварин самців білих нелінійних ми-

шей становить 1% (коливання від 0,5 до 2%); у кістковому мозку щурів – 0,8% (0,2–1,6)%. Стає відмінності в частоті аберантних метафаз у контрольних тварин не спостерігаються.

**Схема проведення дослідів.** Для прогнозу цитогенетичного ефекту хімічних речовин у клітинах кісткового мозку ссавців при хронічній дії достатньо обмежитись підгострим експериментом [12]. Рекомендується проведення 15-добового експерименту. Речовина вводиться зондом внутрішньоплунково з інтервалом 24 години. Контрольним тваринам вводять розчинник в аналогічному об'ємі. Тварин забивають через 6 годин після останнього введення препарату; використовують 5 доз – від 1/10 ЛД<sub>50</sub> і нижче з 3–5-разовим інтервалом між дозами. На кожну групу береться по 6 тварин.

**Статистична обробка.** Визначальним є показник «частота аберантних метафаз». Показник «кількість аберацій на клітину» може визначатись, але він скоріше свідчить про особливості (механізм), ніж про силу дії мутагену.

Висновок про мутагенну дію речовини, що вивчається, ґрунтується на порівнянні частки клітин зі структурними порушеннями хромосом у досліді та контролі за допомогою критерію Стьюдента при  $P < 0,05$ :

$$\bar{X} = \sum_{i=1}^k x_i / n \quad S_{(x)}^2 = (\sum_{i=1}^k X_i^2 - (\sum_{i=1}^k i)^2 / n) / (n - 1)$$

де  $n$  – кількість щурів.

Потім розраховують різницю середніх досліду та контролю та її помилку ( $S_d$ ):

$$S_d = \left( \frac{(n_{\text{досл.}} - 1)S_{\text{досл.}}^2 + (n_k - 1)S_k^2}{n_{\text{досл.}} + n_k - 2} \left( \frac{1}{n_{\text{досл.}}} + \frac{1}{n_k} \right) \right)^{0,05}$$

Далі розраховують значення  $t$ -статистики:

$$t = (x_{\text{досл.}} - x_k) / S_d$$

Отримане значення  $t$ -статистики порівнюють з п'ятипроцентним рівнем значущості розподілу Стьюдента  $t^2v$ , де  $a=0,05$ ,  $v=n_{\text{досл.}} + n_k - 2$ , який визначається за таблицею 4.

Попередньо вводять перетворення Фрімана-Тьюкі для стабілізації дисперсії «частки аберантних клітин» для кожної тварини:

$$X = 0,5 (\arcsin(m/(N+1))^{0,5} + \arcsin((m+1)/(N+1))^{0,5}).$$

Статистичний аналіз результатів мікроскопічного вивчення препаратів на першому етапі досліджень може бути здійснений методом послідовного аналізу [12], суть якого зводиться до наступного. Якщо серед перших 100 проаналізованих метафаз (від 2 тварин) не виявлено жодної аберації, то подальший аналіз цього варіанту досліду слід припинити, оскільки отриманої інформації достатньо при заданих рівнях помилок обох родів ( $a=0,05$ ,  $v=0,20$  – ймовірностях хибнопозитивного або хибнонегативного результатів) для прийняття гіпотези про відсутність цитогенетичного ефекту.

Такий підхід дозволяє відхиляти неактивні препарати при мінімальних затратах часу. Якщо згаданих умов немає, аналіз повинен бути продовжений до досягнення фіксованих об'ємів вибірки (по 100 метафаз від кожної тварини). Якщо на першому етапі препарат неактивний, експеримент припиняють.

#### **4. Метафазний аналіз хромосом у клітинах плодів експериментальних тварин**

Метод Бутчер-Фуго придатний для дослідження зародків мишей 11–13-го, а щурів – 12–14 дня розвитку. Зародки, звільнені від плідних оболонок, вміщують в центрифужні пробірки, з розчином 1,5 мкг/мл колхіцину в 2 мл ізотонічного розчину NaCl і інкубують 1 годину в термостаті при 37°C. Додають в пробірку 0,25 мл 25% розчину трипсину і отримують суспензію клітин, яку через 20 хв центрифугують впродовж 8 хв при 1000 об./хв. Осад ресуспен-

дують у 5 мл гіпотонічного розчину і залишають на 10–15 хв. Після обережного центрифугування гіпотонічний розчин видаляють, а осад ресуспендують у свіжому фіксаторі. Останній змінюють декілька разів, щоразу центрифугуючи і ресуспендуючи клітини в свіжій порції фіксатора. На останньому етапі краплю клітинної суспензії вміщують на предметне скло і легким підігріванням швидко випаровують фіксатор.

Метод Форда-Уллама призначений для дослідження зародків мишей 16–19-го, а щурів – 17–21 дня антенатального онтогенезу. Цей метод можна використати і для цитогенетичного аналізу новонароджених лабораторних тварин. З цією метою шматочок печінки плода вміщують на годинникове скло і подрібнюють спочатку з допомогою загнутих ножиць, а далі вносять пастерівською шпеткою в фізіологічний розчин або середовище 199 до отримання досить однорідної зависі клітин. Мікропіпеткою переносять суспензію клітин в центрифужну пробірку, додаючи розчин колхіцину (1,5 мкг/мл) і інкубують протягом 1 год у термостаті при 37°C. Клітини центрифугують в теплому гіпотонічному розчині і залишають в термостаті на 15–20 хв, після чого центрифугують 10 хв (1000 об./хв), старанно видаляють гіпотонічний розчин, а до осаду доливають 1–2 мл фіксатора і залишають в холодильнику на 30 хв. Заливають першу порцію фіксатора, струшують пробірку з осадом, доливають 1–1,5 мл свіжого фіксатора і через 5–10 хв знову центрифугують. Процедура повторюється декілька разів. Невелику краплю клітинної суспензії наносять на охолоджене вологе предметне скло і висушують.

При реалізації цих методів слід уникати тривалої дії колхіцину (понад 1 год) та не рекомендується перегрівати препарати. Аналіз хромосомних препаратів проводиться так, як і при використанні раніше описаних методів. За нашими даними, частота спонтанних хромосомних аберацій в клітинах зародків постімплантаційних стадій розвитку лабораторних інтактних тварин у мишей і у щурів не перевищує 0,5–0,8% [2]. Слід мати на увазі, що чутливість хромосомного апарату клітин зародків до дії зовнішніх факторів знижується в динаміці антенатального онтогенезу. У зв'язку з цим, при вивченні мутагенної дії різних агентів слід віддавати перевагу використанню методик, які дозволяють оцінювати каріотип зародків на доімплантаційних стадіях розвитку і під час нейруляції та початкового органогенезу. Нижче ми наводимо опис методики Врублевської-Дибана, яка є основною для отримання хромосомних препаратів під час початкового онтогенезу.

Ця методика прийнятна для роботи з зародками мишей 9–10 дня розвитку (10–11 день у щурів). За 30–40 хв до розтину мишам 9–10 дня вагітності вводять 0,4–0,5 мл 0,01% розчину колхіцину. Після евтаназії розсікають ножицями роги матки та дістають зародки, які після огляду під бінокулярною лупою вміщують на 20 хв в 1% розчин цитрату натрію при 37°C. Фіксація проводиться холодною сумішшю абсолютного метанолу і льодяної оцтової кислоти (3:1). Тривалість фіксації при температурі (-4°C) біля 30 хв, після чого зародки переносять в розчин оцтовокислого орсеїну (2% розчин орсеїну в 50% оцтовій кислоті).

Цей етап є вкрай важливим, оскільки надто сильно пофарбовані орсеїном препарати згодом виявляються стійкими до трипсинізації, що ускладнює або робить неможливим диференційне пофарбування хромосом. Оптимальний час пофарбування тканин оцтовокислим орсеїном – 30 хв. Після цього зародки вміщують в 50% розчин оцтової кислоти і залишають на ніч при температурі (-4°C). Безпосередньо перед приготуванням препаратів оцтову кислоту на 1–2 хв замінюють на суміш 50% розчину молочної кислоти і льодяної оцтової кислоти (3:1). Невеликі краплі суспензії наносять на знежирене предметне скло, дають їм повністю розтектись і швидко фіксують сумішшю метанолу і оцтової кислоти. Свіжовиготовлені препарати одразу вміщують на 5–10 хв у теплий соренсенівський буфер (рН 7,7), промивають дистильованою водою і висушують. За необхідності виконують диференційне пофарбування хромосом.

При дослідах на зародках лабораторних тварин речовини, що випробовуються, можна вводити впродовж кількох днів вагітності (наприклад, з 1-го по 10-й, або з 10-го по 13-й). Забій тварин і облік результатів дослідів краще виконувати через 24 години після дії речовини.

Рівень хромосомних аберацій в клітинах зародків щурів на постімплантаційних стадіях розвитку становить 0–0,5% [2].

## **5. Аналіз частоти поліхроматофільних еритроцитів з мікроядрами у кістковому мозку лабораторних тварин (мікроядерний тест)**

У 1973 році J.A.Headdle та W.Schmid незалежно запропонували мікроядерний тест, який ґрунтується на обліку мікроядер у поліхроматофільних еритроцитах кісткового мозку. Суть феномену полягає в тому, що під час поділу клітин ацентричні фрагменти хромосом і відсталі хромосоми, які не увійшли в дочірні ядра, формують в цитоплазмі клітин одне, рідше два ДНК-містких утворення, що отримали назву мікроядер. Таким чином, облік частоти клітин з мікроядрами вказує на цитогенетичну активність фактора, що вивчається. Найнадійніший результат дає аналіз мікроядер в еритроцитах кісткового мозку, які дозрівають – поліхроматофільних еритроцитах. Диференційне фарбування дозволяє легко відрізнити клітини, які недавно пройшли мітоз, від зрілих еритроцитів. Тривалість стадії поліхроматофільних еритроцитів близько 24 годин, тому доцільно застосовувати мікроядерний тест тільки в гострих дослідах. Крім показника частоти поліхроматофільних еритроцитів з мікроядрами, можна на тих же препаратах оцінити клітинний склад кісткового мозку.

**Лабораторні тварини.** Експерименти проводять на білих нелінійних мишах масою 18–20 г або щурах масою 180–200 г. Можна використовувати інші види лабораторних тварин.

### **Реактиви:**

1. Сироватка крові людини IV групи (АВО) зберігається в морозильнику. Перед дослідом розморозити і інактивувати на водяній бані при 60° упродовж 2 годин;

2. Барвник Май-Грюнвальд;

3. Барвник Гімза;

4. Фосфатний буфер рН 7,0 готується таким чином: 2,85 мл розчину А (2,26 г  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  на 250 мл дистильованої води) + 2,15 мл розчину Б (5,97 г  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  на 250 мл дистильованої води) на 1 літр дистильованої води. Розчин А і Б зберігають у холодильнику. Фосфатний буфер застосовується на усіх етапах фарбування препаратів.

**Методика.** Застосовують методику в модифікації В.В.Юрченко і Є.Г.Фельдт. Тварин піддають етаназії методом цервікальної дислокації; виділяють стегнові кістки (у щурів – одну кістку) і очищують марлею від м'язів. Відрізають верхній кінець стегнової кістки так, щоб було видно отвір каналу кістки. В серологічні пробірки об'ємом до 1 мл наливають 0,8 мл сироватки. Набирають в шприц 0,2–0,5 мл сироватки з пробірки і, вставивши голку шприца в канал кістки, вимивають кістковий мозок в пробірку. Цю процедуру повторюють 2–3 рази. Пробірки з суспензією клітин центрифугують 5 хвилин при 1000 об./хв. Супернатант відсмоктують. Осад ресуспендують пастерівською піпеткою, наносять на кінець сухого знежиреного скла і другим склом роблять мазок. Після висушування на повітрі мазок фарбують за такою методикою:

а) мазок фіксують в метанолі впродовж 3 хвилин;

б) наносять на мазок барвник Гімза, розведений 1:6 в буфері – 10 хв;

в) препарати двічі промивають в дистильованій воді;

г) наносять на скло нерозведений барвник Май-Грюнвальд – 3 хв;

д) препарати двічі промивають в дистильованій воді і висушують на повітрі.

**Аналіз препаратів.** Аналіз проводиться під мікроскопом з використанням імерсійного об'єктива 10x90. Придатними для аналізу вважаються препарати з еритроцитами, поверхня яких не має виростів і складок. Поліхроматофільні еритроцити мають сірувато-голубовате забарвлення, нормохромні – оранжево-рожеве. Мікроядра – круглі, з чіткою границею утворення, які мають темне забарвлення, схоже на забарвлення ядер. Аналіз проводять на шифрованих препаратах. Підраховують 1000 поліхроматофільних еритроцитів і визначають кількість їх з мікроядрами. У інтактних тварин кількість поліхроматофільних еритроцитів з мікроядрами коливається від 0 до 5 на 1000 поліхроматофільних еритроцитів. Середній рівень поліхроматофільних еритроцитів з мікроядрами в інтактних білих мишей і щурів складає 0,2%.

**Схема проведення дослідів.** Вивчення мутагенного ефекту речовин у мікроядерному тесті проводиться в гострому досліді. Речовина вводиться зондом внутрішньошлунково 2-разово з



інтервалом між введенням 24 години. Евтаназію тварин проводять через 6 годин після останнього введення. Звичайно досліджують 4 дози в інтервалі від  $1/5$  ЛД<sub>50</sub> до  $1/500$  ЛД<sub>50</sub>. Контрольним тваринам вводять розчинник. До групи береться по 6 тварин.

**Статистична обробка результатів.** Порівняння частот поліхроматофільних еритроцитів з мікроядрами в досліді і контролі проводиться за критерієм Стьюдента при попередньому перетворенні даних по кожній тварині:

$$W = \arcsin \frac{r + 0,375}{n + 0,75}$$

де  $r$  – кількість поліхроматофільних еритроцитів з мікроядрами у тварини;  $n$  – загальна кількість поліхроматофільних еритроцитів у тварин [2, 6].

## 6. Цитогенетичні порушення і сестринські хроматидні обміни *in vitro*

Цитогенетичні тести *in vitro* спрямовані на те, щоб продемонструвати індукцію хромосомних порушень в клітинах, що культивуються, які видно під світловим мікроскопом. Як правило, в цих тестах клітини вивчаються на стадії метафази. Фізичний чи хімічний фактор класифікується як мутаген, якщо він викликає збільшення кількості розривів хромосом у порівнянні з контрольними зразками.

Багато факторів індують видимі хромосомні пошкодження лише після проходження клітиною повного циклу реплікації ДНК, тому схема постановки тесту повинна передбачити певний проміжок часу після обробки, достатній для розвитку аберацій.

Підготовка матеріалу для вивчення хромосом технічно проста, чим безсумнівно, частково пояснюється широке використання цитогенетичних тестів *in vitro*.

Сестринські хроматидні обміни (СХО) – це приблизно симетричні обміни між двома хроматидами всередині однієї хромосоми (тобто між ідентичними послідовностями ДНК). СХО можна виявити під мікроскопом тільки в тому випадку, якщо стають помітними сестринські хроматиди. Цією обставиною пояснюються відмінності між методами культивування при аналізі СХО і тими, які використовуються для підрахунку хромосомних аберацій в метафазі. Через простоту підготовки препаратів і підрахунку СХО, цей метод отримав дуже широке поширення в дослідженнях речовин на мутагенність. Сама по собі індукція СХО, як правило, не вважається достатнім доказом мутагенності будь-якого фактора.

**Методика дослідження.** Методики, що застосовуються в дослідженнях хромосомних аберацій, були детально описані [13]. Для аналізу СХО використовуються лінії фібробластів, виділених із яєчника китайського хом'ячка, які перевиваються, і лімфоцити (моноядерні лейкоцити) периферійної крові людини. Незначна кількість хромосом в клітинах СХО значно полегшує підрахунок.

Лімфоцити периферійної крові людини не здатні до спонтанного поділу в культурі, але можуть бути стимульовані до поділу шляхом обробки яким-небудь мітогеном (фітогемаглютиніном). Проводять культивування з свіжоотриманою кров'ю протягом не більше декількох циклів поділів. Першої метафази після внесення мітогену клітин досягають не раніше, ніж через 36–40 годин, після чого вони діляться приблизно кожні 18 годин.

Спочатку збирають відомості про токсичність хімічного фактора, який досліджується, а згодом в цитогенетичних дослідженнях використовують його концентрації аж до таких, які справляють на клітини деяку токсичну дію (визначаються шляхом вимірювання мітотичного індексу). Для отримання достовірних даних щодо обліку хромосомних аберацій необхідно ставити експерименти мінімум в трьох повторах з використанням не менше 3 доз, не враховуючи негативного контролю. При використанні культури лімфоцитів рекомендується для кожного експерименту брати кров, як мінімум, від двох донорів. Позитивний контроль – відомий мутаген («прямий» чи «непрямий»). Дози речовини, що тестується, повинні бути від концентрацій, що виявляють деякий цитотоксичний ефект, до концентрацій, які становлять  $1/4$  або  $1/8$  від цієї

величини. Оскільки багато мутагенів викликають ефект лише в дозах, близьких до токсичних, тестування низьких концентрацій в ході рутинного скринінгу рідко дає будь-які переваги.

Культуру клітин вирощують в невеликих культуральних флаконах або безпосередньо на стерильних предметних або покривних скельцях, поки клітини не почнуть проліферувати. Після цього додають речовину, що вивчається; краще при цьому змінити культуральне середовище новим, в якому міститься речовина, що тестується. Лімфоцити не прикріплюються до стінок флаконів або скелець, і їх вирощують в невеликих пляшечках як суспензійну культуру. В культуру лімфоцитів речовина, що тестується, може бути внесена безпосередньо при її постановці. Проте краще чекати, поки клітини перейдуть стадію  $G_0$ , оскільки токсичні концентрації речовини можуть перешкоджати поділу клітин. Отже, внесення речовини, яка тестується, за 24–36 годин після початку культивування, очевидно є більш ефективним.

Інколи виникає необхідність модифікації тест-системи: наприклад, леткі або газоподібні сполуки необхідно тестувати у замкнутому просторі. Інколи компоненти сироватки, яка застосовується в культуральному середовищі, можуть зв'язуватись з фактором, що тестується; в цих випадках доцільно впродовж декількох годин обробляти клітини безсироватковим середовищем, після чого продовжити культивування в нормальному середовищі. Еритроцити, які присутні в культурах лімфоцитів, також здатні зв'язуватись з речовиною, що тестується. Існують різні методи виділення лімфоцитів, хоча культури з цільної крові використовуються більш широко. В досліді слід використовувати систему метаболічної активізації для виявлення мутагенності можливих метаболітів сполук, що тестуються (за винятком тих випадків, коли доведено, що клітини лінії, яка використовується, мають здатність до метаболізму, або є надійні свідчення, що речовина, яка вивчається, має пряму дію). При тестуванні хімічних речовин з невідомою мутагенною активністю необхідно ставити досліди, як з метаболічною активацією, так і без неї.

Час експозиції для обох тест-систем (з активацією і без) різний. Важливо пам'ятати, що система активації (тобто S-9 фракція) може справляти токсичну дію на клітини. Внаслідок цього в досліді з використанням фракції S-9 дія сполуки, яка тестується, може бути обмежена лише 0,5–3 годинами.

Після введення речовини, що тестується, клітини культивують протягом одного або двох клітинних циклів з тим, щоб більшість клітин досягла першої метафази після обробки, а потім проводять фіксацію. Перед фіксацією додають речовину, яка блокує структуру веретена поділу, наприклад, колхіцин, для того, щоб зупинити поділ клітин на стадії метафази. Клітини обробляють гіпотонічним розчином (наприклад, 0,55% хлористим калієм), після чого фіксують свіжопріготовленою сумішшю метанолу і льодової оцтової кислоти (3:1). Клітини фарбують барвником Гімза, орсеїном або іншим барвником для хромосом, після чого вивчають під мікроскопом. Препарати повинні бути зашифровані. При кожному повторі аналізують мінімум 100 метафаз.

**Оцінка індукції сестринських хроматидних обмінів.** Постановка культури для демонстрації СХО здійснюється також і для оцінки хромосомних аберацій, але поряд зі сполукою, що тестується, в культуру вносять бромдезоксигуанідин (БДУ) в концентраціях 10–25 мкмоль. Ця речовина присутня в культурі протягом усього періоду від обробки до фіксації. Необхідно, щоб клітини перед тим, як вони будуть зафіксовані, завершили два цикли реплікації ДНК (тобто дві S фази). БДУ включається замість тимідину в ДНК, що заново синтезується, і отже, в першій метафазі усі хроматиди будуть нести одну нитку ДНК, що містить БДУ, і одну, що містить тимідин. Хроматиди в анафазі розділяються; в наступному S-періоді ДНК, що заново синтезується, вже містить БДУ. Оскільки одна матриця ДНК містить БДУ, а друга ні, то тепер хромосоми будуть включати ДНК, яка в одній хроматиді змінена повністю (обидві нитки), а в другій – лише наполовину (одна нитка). Ці хроматиди в результаті обробки (описано нижче) забарвлюються по-різному (диференційно).

Фіксація клітин виконується звичайним способом, але після цього клітини фарбують барвником Hoechst 33258, обробляють УФ-випромінюванням і фарбують барвником Гімза. Хроматиди, в яких БДУ містить обидві нитки ДНК, забарвлюються набагато слабше, ніж хрома-

тиди, що містять одну нитку з БДУ. Якщо стався СХО, то в одній з хроматид змінюється забарвлення, при цьому спостерігаються зміни в другій хроматиді [15]. Такі хромосоми в другій метафазі називають «арлекінами». Хромосоми в клітинах, зафіксованих в першій метафазі, мають рівномірно і темнозабарвлені хроматиди, а хромосоми третьої і наступних метафаз виглядають як суміш темнозабарвлених і «арлекінів». Оскільки метафазу другого поділу можна встановити за наявністю хромосом – «арлекінів», проблема затримки мітозів при аналізі СХО є не настільки суттєвою, як в тесті на індукцію хромосомних аберацій [15].

**Статистична обробка результатів.** Сестринські хроматидні обміни є одним із цитогенетичних тестів на генотоксичність, які найчастіше використовуються. Тест СХО, зокрема, рекомендується як індикаторний при виявленні мутагенного потенціалу лікарських засобів, а також промислових технічних сполук. Результати аналізу можуть бути представлені у вигляді двох еквівалентних показників: «кількість СХО на одну хромосому» і «кількість СХО на одну клітину».

Розподіл СХО в клітинах залежить від багатьох факторів: тип культури клітин, тип самих клітин, мутагенне навантаження. Розглянемо два варіанти статистичного аналізу – один для гомогенних культур клітин (частіше усього це лінії, що перевиваються, типу СХО) і для гетерогенних культур (таких, як лімфоцити крові).

#### А. Аналіз СХО у культурах клітин, що перещеплюються

У випадку статистичної оцінки результатів СХО в культурах клітин, що перещеплюються, рекомендується застосування тренд-тесту Кокрена-Армітейджа для розподілу Пуассона. Цей тест визначає, наскільки відповідь  $g$  посилюється при підвищенні дози  $L$ . Таким чином, він є тестом для позитивної прямолінійної регресії. Тому дозова залежність повинна бути лінійною (хоча цей тест достатньо ефективний і при значних відхиленнях від лінійності). Найчастіше це досягається при логарифмуванні значень дози речовини, що досліджується.

Однак в цьому випадку виникає проблема нульової дози  $L_0$ , тому що  $\lg(0)$  є невизначеним. Отже краще брати значення  $L_0$  такими, щоб вони були до першої концентрації речовини, що досліджується, в інтервалі, який дорівнює середньому інтервалу між дозами. Такі значення  $L_0$  можна підрахувати за формулою:

$$L_0 = L_1 - ((L_k L_1)/(k - 1)) \quad 6.1$$

де  $L_k, i=0,1,\dots,k$  – дози речовини, що досліджується.

Процедура статистичного оцінювання Кокрена – Армітейджа полягає в наступному. Отримані дані розташовуються у вигляді таблиці (табл. 5). Позначимо:

$$P = r_1/c \text{ і } L = \sum_{i=0}^k c_i L_i / c$$

Тоді статистика Кокрена – Армітейджа буде мати вираз:

$$z = \sum_{i=0}^k L_i (r_i - c_i P) / (P \sum_{i=0}^k c_i (L_i - L)^2)^{0.5} \quad 6.2$$

Якщо нульова гіпотеза вірна, то статистика  $z$  асимптотично розподілена як  $N(0,1)$ .

У таблиці 5 подані дані індукції диметилнітрозаміном СХО в клітинах китайського хом'ячка. Спочатку визначають значення  $P$  і  $L$ :  $P = 6,987$ ,  $L = 1,349$ ,  $c_i P = 349,33$ . Тоді за формулою (6.2) отримасмо, що  $P < 0,0001$ . Таким чином, диметилнітрозамін індукує СХО в клітинах китайського хом'ячка.

#### Б. Статистична обробка даних аналізу СХО в культурі лімфоцитів

Оскільки розподіл СХО в лімфоцитах людини може варіювати в залежності від різних причин, то для статистичної оцінки результатів аналізу СХО в культурі лімфоцитів пропонується використовувати критерій Терпстра-Джонкхієра. Цей тест є непараметричним аналогом тренд-тесту.

Процедура статистичної оцінки полягає в наступному. Отримані дані розташовуються в таблиці (табл. 7). Вони складаються з  $N = \sum_{j=1}^k n_j$  спостережень, по  $n_j$  спостережень на  $j$ -ю обробку,  $j=1, \dots, k$ .

Під спостереженням тут розуміють кількість проаналізованих клітин для кожної дози речовини, що досліджується. Тоді  $X_{nk}$  – це кількість СХО в клітині при дозі  $k$ .

Далі підраховується  $k(k-1)/2$  значень статистики Манна-Уїтні

$U_{uv} < v$ , де

$$U_{uv} = \sum_{i=1}^{n_u} \sum_{i=1}^{n_v} (x_{ui} \cdot x_{vi}) \quad 6.3$$

$a ('a, b) = 1$ , якщо  $'a < b$

$= 5$ , якщо  $a = b$

$= 0$ , якщо  $a > b$ .

Далі визначається сума  $k(k-1)$  значень статистики Манна-Уїтні

$$J = \sum_{u < v} U_{uv} = \sum_{u=1}^k \sum_{v=u+1}^k U_{uv} \quad 6.4$$

Оскільки за реальних умов розрахунки ведуть для великої вибірки ( $n > 10$ ), то слід оцінювати не саму статистику  $J$ , а її наближення для великої вибірки:

$J^* = (J - E_0(J)) / (\text{var}_0(J))^{0.5}$ , де

$$E_0(J) = (N^2 - \sum_{j=1}^k n_j^2) / 4i \quad 6.5$$

$$\text{var}_0(J) = (N^2(2N+3) - \sum_{j=1}^k n_j^2(2n_j+3)) / 72$$

При виконанні нульової гіпотези статистика  $J^*$  має асимптотичний розподіл  $N(0,1)$ .

Розглянемо конкретний приклад. У таблиці 8 наведені дані з вивчення індукції СХО 3-амінобензамідом в лімфоцитах людини. Спочатку, скориставшись формулою (6.3), підрахуємо  $k(k-1)/2$  статистики Манна-Уїтні:  $U_{12}=246,5$ ,  $U_{13} = 293,5$ ,  $U_{14}=313$ ,  $U_{15} = 359$ ,  $U_{16}=341$ ,  $U_{23}= 257$ ,  $U_{24} = 289,5$ ,  $U_{25}=337$ ,  $U_{26} = 319$ ,  $U_{34}=234,5$ ,  $U_{35} = 268$ ,  $U_{36}=260,5$ ,  $U_{45}=209$ ,  $U_{46} = 227$ ,  $U_{56}=220$ . Далі, за формулою 6.4 підраховується сума статистик Манна-Уїтні  $J=4174,5$  та за формулою 6.5 визначається значення статистики  $J^*$ :

$$J^* = (4174,5 - 0,25 \cdot (120^2 - 6 \cdot 20^2)) / ((120^2 \cdot 24 - 6 \cdot 43 \cdot 20^2) / 72)^{0.5} = 5,41$$

З таблиці (додаток 2) знаходимо, що нульова гіпотеза відхиляється на рівні значущості, меншому за 0,001 (20 посилення на математичну обробку Лазутки).

## Додатки

Таблиця 1

*Перетворення і оцінка середніх параметрів показника, що реєструється (кількість ревертантів на чашках), отриманого при тестуванні препарату на тест-штамі Salmonella typhimurium TA 1537*

Доза препарату, мкг/г	МС+			Середнє $Y_{ij}$	МС-			Середнє $Y_{ij}$
	Значення показників, що тестуються				Значення показників, що тестуються			
0,1	X 6 5 6			1,73	X 10 9 7			2,15
	Y 1,79 161 1,79				Y 2,30 2,20 1,95			
1,0	X 12 7 16			2,40	X 4 10 11			2,03
	Y 2,48 1,95 2,77				Y 1,39 2,30 2,40			
10,0	X 6 10 11			2,16	X 10 11 9			2,30
	Y 1,79 2,30 2,40				Y 2,30 2,40 2,20			
100,0	X 16 13 8			2,47	X 8 15 16			2,52
	Y 2,77 2,56 2,08				Y 2,08 2,71 2,77			
10000,0	X 21 18 23			3,02	X 56 25 31			3,56
	Y 3,04 2,89 3,14				Y 4,03 3,22 3,43			
0	X 9 19 16			2,64	X 5 12 8			2,06
	Y 2,20 2,94 2,77				Y 1,61 2,48 2,48			

Таблиця 2

*Випадкові залишки, які отримуються із середніх параметрів*

Доза препарату мкг/г	Випадкові залишки, які отримуються $d_{ijk}=Y_{ijk}-Y_{ij}$					
	МС+			МС-		
0,1	+0,06	-0,12	+0,06	+0,15	+0,05	-0,20
1,0	+0,08	-0,45	+0,37	-0,64	+0,27	+0,37
10,0	-0,37	+0,14	+0,24	0	+0,10	-0,10
100,0	+0,30	+0,09	-0,39	-0,44	+0,19	+0,25
10000,0	+0,02	-0,13	+0,12	+0,47	-0,34	-0,13
0	-0,44	+0,30	+0,13	-0,45	+0,42	+0,02

Таблиця 3

*Схема експерименту*

Тест-штами	Досліджуван-на речовина	доза мкг/г	Кількість колоній ревертантів на чашку										
			МС+				МС-						
			$X_1$	$X_2$	$X_3$	$X$	$X_0/X_k$	$X_1$	$X_2$	$X_3$	$X$	$X_0/X_k$	
		0,1											
		1,0											
ТА		10,0											
		100,0											
100		1000,0											
		-К											
		+К											
		$K_{\phi}$											

МС+ -- варіант дослід з метаболічною активацією

МС- -- варіант дослід без метаболічної активації

$X_1, X_2, X_3$  -- кількість колоній на чашку

- К -- негативний контроль

+ К -- позитивний контроль

$K_{\phi}$  -- контроль ефективності функціонування системи метаболічної активації

Кількість ступенів свободи	Рівень значущості P				
	0,1	0,05	0,02	0,01	0,001
1.	6,31	12,70	31,82	63,66	-
2.	2,92	4,30	6,97	9,93	30,60
3.	2,35	3,18	4,54	5,84	12,94
4.	2,13	2,78	3,75	4,60	8,61
5.	2,02	2,57	3,37	4,03	6,86
6.	1,94	2,45	3,14	3,71	5,96
7.	1,90	2,37	3,00	3,50	5,41
8.	1,86	2,31	2,90	3,36	5,04
9.	1,83	2,26	2,82	3,25	4,78
10.	1,81	2,23	2,76	3,17	4,59
11.	1,80	2,20	2,72	3,11	4,44
12.	1,78	2,18	2,68	3,06	4,32
13.	1,77	2,16	2,65	3,01	4,22
14.	1,76	2,15	2,62	2,98	4,14
15.	1,75	2,13	2,60	2,95	4,07
16.	1,75	2,12	2,58	2,92	4,02
17.	1,74	2,11	2,57	2,90	3,97
18.	1,73	2,10	2,55	2,88	3,92
19.	1,73	2,09	2,54	2,86	3,88
20.	1,73	2,09	2,53	2,85	3,85
21.	1,72	2,08	2,52	2,83	3,82
22.	1,72	2,07	2,51	2,82	3,79
23.	1,71	2,07	2,50	2,81	3,77
24.	1,71	2,06	2,49	2,80	3,75
25.	1,71	2,06	2,49	2,79	3,73
26.	1,71	2,06	2,48	2,78	3,71
27.	1,70	2,05	2,47	2,77	3,69
28.	1,70	2,05	2,47	2,76	3,67
29.	1,70	2,05	2,46	2,76	3,66
30.	1,70	2,04	2,46	2,75	3,65
	1,64	1,96	2,33	2,53	3,29

Таблиця 5

Таблиця для даних аналізу СХО тестом Кокрена-Армітейджа

Рівень дози	Кількість сестринських хроматидних обмінів	Кількість проаналізованих клітин
$L_0$	$r_0$	$c_0$
$L_1$	$r_1$	$c_1$
...	...	...
$L_k$	$r_k$	$c_k$
Сума	$r = \sum_{i=0}^k r_i$	$c = \sum_{i=0}^k c_i$

Індуція СХО в клітинах китайського хомячка диметилнітрозоаміном

Доза мкг/мл	Логарифм дози	Кількість СХО	Кількість проаналізованих клітин
0,0	-5,179	293	50
0,005	-3,699	323	50
0,05	-2,699	329	50
0,5	-1,699	397	50
50,0	1,699	352	50
5000,0	3,699	402	50
		$r_1 = 2096$	$c = 300$

Таблиця 7

Таблиця для даних аналізу СХО Терпстра-Джонкхіера

	номер клітини	دوزи речовини			
		1	2	...	k
Кількість СХО в клітинах	1	$X_{11}$	$X_{12}$	...	$X_{1k}$
	2	$X_{21}$	$X_{22}$	...	$X_{2k}$
	...	...	...	...	...
	n	$X_{n1}$	$X_{n2}$	...	$X_{nk}$

Таблиця 8

Індуція СХО в лімфоцитах крові людини 3-амінобензамідом

N кл.	Дози 3-амінобензаміду, ММ					
	0,0	1,0	2,0	3,0	4,0	5,0
	1	2	3	4	5	6
1.	9	7	8	24	17	13
2.	15	12	24	19	12	9
3.	8	10	21	8	18	16
4.	8	11	7	18	13	8
5.	10	7	10	14	19	23
6.	12	12	11	24	17	24
7.	13	10	9	16	13	13
8.	9	8	8	12	14	7
9.	12	13	14	20	16	11
10.	5	8	24	19	20	19
11.	11	15	12	12	15	24
12.	9	10	15	9	13	22
13.	6	13	16	8	9	18
14.	9	5	10	9	15	10
15.	4	12	11	13	19	13
16.	7	9	7	7	14	17
17.	9	13	11	18	10	12
18.	4	7	14	19	10	13
19.	13	8	12	7	11	20
20.	15	14	13	13	17	20

Значення статистики Даннета

K v	1	2	3	4	5	6	7	8	9
5	2,02	2,44	2,68	2,85	2,98	3,08	3,16	3,24	3,30
6	1,94	2,34	2,56	2,71	2,83	2,92	3,00	3,07	3,12
7	1,89	2,27	2,48	2,62	2,73	2,82	2,89	2,95	3,01
8	1,86	2,22	2,42	2,55	2,66	2,74	2,81	2,87	2,92
9	1,83	2,18	2,37	2,50	2,60	2,68	2,75	2,81	2,86
10	1,81	2,15	2,34	2,47	2,56	2,64	2,70	2,76	2,81
11	1,80	2,13	2,31	2,44	2,53	2,60	2,67	2,72	2,77
12	1,78	2,11	2,29	2,41	2,50	2,58	2,64	2,69	2,74
13	1,77	2,09	2,57	2,39	2,48	2,55	2,61	2,66	2,71
14	1,76	2,08	2,25	2,37	2,46	2,53	2,59	2,64	2,69
15	1,75	2,07	2,24	2,36	2,44	2,51	2,57	2,62	2,67
16	1,75	2,06	2,23	2,34	2,43	2,50	2,56	2,61	2,65
17	1,74	2,05	2,22	2,33	2,42	2,49	2,54	2,59	2,64
18	1,73	2,04	2,21	2,32	2,41	2,48	2,53	2,58	2,62
19	1,73	2,03	2,20	2,31	2,40	2,47	2,52	2,57	2,61
20	1,72	2,03	2,19	2,30	2,39	2,46	2,51	2,56	2,60
24	1,71	2,01	2,17	2,29	2,36	2,43	2,48	2,53	2,57
30	1,70	1,99	2,15	2,25	2,30	2,40	2,45	2,50	2,54
40	1,68	1,97	2,13	2,23	2,29	2,37	2,42	2,47	2,51
60	1,67	1,95	2,10	2,21	2,28	2,35	2,39	2,44	2,48
120	1,66	1,93	2,08	2,18	2,26	2,32	2,37	2,41	2,45
	1,64	1,92	2,06	2,16	2,23	2,29	2,34	2,38	2,42

Додаток 2

Математична обробка Лазутки

t	Соті долі t									
	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9
0,0	1000	9920	9840	9761	9681	9601	9521	9441	9361	9283
0,1	9203	9124	9045	8966	8887	8808	8729	8650	8571	8493
0,2	8415	8337	8259	8281	8103	8026	7949	7872	7795	7718
0,3	7642	7566	7489	7414	7338	7263	7188	7114	7039	6965
0,4	6892	6818	6745	6672	6599	6527	6455	6383	6312	6241
0,5	6171	6101	6031	5961	5892	5823	5755	5687	5619	5552
0,6	5485	5419	5353	5287	5222	5157	5092	5028	4965	4902
0,7	4839	4777	4714	4654	4593	4532	4472	4413	4354	4295
0,8	4237	4179	4122	4065	4009	3953	3898	3843	3789	3753
0,9	3681	3628	3576	3524	3472	3421	3370	3320	3371	3222
1,0	3173	3125	3077	3030	2983	2937	2891	2846	2801	2757
1,1	2713	2670	2627	2585	2543	2501	2460	2420	2360	2340
1,2	2301	2263	2225	2187	2158	2113	2077	2041	2025	1970
1,3	1936	1902	1868	1835	1802	1770	1738	1707	1676	1645
1,4	1615	1585	1556	1527	1499	1470	1442	1416	1389	1362
1,5	1336	1310	1285	1260	1236	1211	1188	1164	1141	1118
1,6	1095	1374	1052	1031	1010	0989	0969	0949	0930	0910
1,7	0891	1073	0854	0836	0819	0801	0784	0767	0751	0734
1,8	0719	0703	0688	0672	0658	0643	0628	0615	0601	0588
1,9	0574	0561	0549	0536	0524	0512	0500	0488	0477	0466
2,0	0455	0444	0434	0423	0413	0404	0394	0384	0375	0366
2,1	0357	0349	0340	0332	0323	0315	0308	0300	0292	0285
2,2	0278	0271	0264	0258	0251	0244	0238	0232	0226	0220
2,3	0214	0209	0203	0198	0193	0188	0183	0178	0173	0168
2,4	0164	0159	0155	0151	0147	0142	0139	0135	0131	0128
2,5	0124	0121	0117	0114	0111	0108	0105	0102	0099	0096
2,6	0093	0091	0088	0085	0082	0080	0078	0076	0074	0071
2,7	0068	0067	0065	0063	0061	0060	0058	0056	0054	0053
2,8	0051	0049	0048	0046	0045	0044	0042	0041	0040	0038
2,9	0037	0036	0035	0034	0033	0032	0031	0030	0029	0028
3,0	0027	0019	0014	0010	0007	0005	0003	0002	0001	0001



## Література

1. Бочков Н.П., Демин Ю.С., Лучник Н.В. Классификация и методы учета хромосомных aberrаций в соматических клетках//Генетика.– 1972.– Т.8, №5.– С. 133–141.
2. Барияк И.Р., Бужиевская Т.И., Быкорез А.И. и др. Генетические последствия загрязнения окружающей среды.– К.: Наук. думка, 1989.– 232 с.
3. Методические рекомендации по проверке мутагенных свойств у новых лекарственных препаратов/(Изд. официальное. Фармакологический комитет МЗ СССР). М., 1981.– 55 с.
4. Ames B.N., Durston W.E., Yamasaki E., Lee F.D. Carcinogenes are mutagenes: a simple test system combining liver homogenates for activation and bacteria for detection//Proc. Nat. Acad. Sci. USA.– 1973.– V.70.– P. 2281–2285.
5. Фонштейн Л.М., Калинина Л.М., Полукина Г.Н. и др. Тест-система оценки мутагенной активности загрязнителей среды на Salmonella/Методические указания.– М., 1977.– 21 с.
6. Красовский Г.Н., Журков В.С., Жалдакова З.И. и др. Методические указания по изучению мутагенной активности химических веществ при обосновании их ПДК в воде.– М., 1986.– 23 с.
7. Besler W.L., Steven Gr., Shatter D. et al. A standartized procedure for quantification of the Ames Salmonella microsome mutagenecity test//Envir. Mutagen.– 1981.– V.3, №2.– P. 123–139.
8. Бобринев Е.В., Облаенко Н.Г., Подольная М.А. и др. Анализ и планирование экспериментов с использованием тестов Salmonella/микросомы//Генетика.– 1983.–Т.19, №11.– С. 1835–1839.
9. Дуган А.М., Журков В.С., Абилов С.К. Критерии учета мутагенных эффектов в тесте Эймса//Цитол. и генетика.– 1990.– Т. 25, №6.– С. 41–45.
10. Подольная М.А., Бобринев Е.В., Ревазова Ю.А. Анализ некоторых методов статистической обработки результатов экспериментов по индукции доминантных летальных мутаций на зародышевых клетках мышей//Генетика.– 1982.– Т.17, №4.– С. 651–657.
11. Журков В.С. Подходы к регламентации химических загрязнителей окружающей среды, обладающих мутагенной активностью/Медицинские проблемы охраны окружающей среды: Сб. научных трудов (под ред. Г.И.Сидоренко).– М., 1981.– С. 88–95.
12. Вальд А. Последовательный анализ.– М.: Физматиздат, 1960.– 329 с.
13. Evans H.J. Cytological methods for detecting chemical mutagens/Chemical mutagens: Principles and methods for their detection (Hollanger A., ed.).– NY, London: Plenum Press, 1976.– V.4.– P. 1–29.
14. Bogum A. Isolation of mononuclear cells and granulocytes from human blood//Scand. J. Clin. Lab. Invest.– 1968.– V.21 (Suppl. 97).– P. 77–89.
15. Гигиенические критерии состояния окружающей среды (51)/Руководство по краткосрочным тестам для выявления мутагенных и канцерогенных свойств химических веществ.– Женева: Совместное издание программы ООН по окружающей среде Международной организации здравоохранения, 1989.– 21 с.

## **ВИВЧЕННЯ КАНЦЕРОГЕННИХ ВЛАСТИВОСТЕЙ НОВИХ РЕЧОВИН ТА ЛІКАРСЬКИХ ЗАСОБІВ**

Чехун В.Ф.,  
Кулик Г.І.,  
Шарикіна Н.І.,  
Налескіна Л.А.,  
Баглій Є.А.,  
Черниченко І.О.,  
Цапенко В.Ф.

### **Вступ**

Особливе місце на етапі експериментальної апробації нових лікарських засобів (ЛЗ) займає виявлення та запобігання небезпеки їх дії як канцерогенних речовин. Незважаючи на те, що цій проблемі присвячено велику кількість робіт та низку методичних рекомендацій [1–9], деякі особливості питання про канцерогенність лікарських речовин недостатньо відомі дослідникам. Згідно з даними Міжнародного агентства з вивчення раку (МАВР), 115 хімічних сполук, їх похідних та комбінацій визнані канцерогенними для людини і зняті з виробництва.

Доведено, що пухлини у людини можуть викликати радіоактивні речовини, препарати, до складу яких входить миш'як, похідні амінофенолу, алкілюючі агенти, деякі імунодепресанти, група гормональних препаратів, їх похідні та ін.

Тестування лікарських засобів на канцерогенну активність має багато спільного з методичними принципами вивчення канцерогенної активності хімічних речовин, біологічних продуктів та харчових домішок. Проте є велика різниця у тлумаченні результатів і оцінці потенційної небезпеки ЛЗ для людини. Це пояснюється тим, що окремі категорії людей, в тому числі діти, при певних захворюваннях змушені тривалий час або протягом багатьох років вживати ліки, і відсутність добре налагодженої служби перевірки лікарських засобів на канцерогенні властивості може коштувати їм життя, оскільки дія канцерогенного агента або його метаболітів полягає у безпосередньому або опосередкованому взаємозв'язку з геномом клітини, наслідком чого може бути виникнення злоякісного новоутворення. До цього часу в Україні не існує чітко сформульованих узагальнених вимог до вивчення канцерогенних властивостей ЛЗ.

Враховуючи зазначене, виникла необхідність у створенні методичних рекомендацій стосовно тестування ЛЗ та речовин як потенційних ЛЗ на канцерогенність та оцінки їх імовірної небезпеки для людини. У подальшій роботі необхідно вирішувати питання про дозвіл на клінічні випробування нового лікарського засобу та впровадження його у медичну практику тільки в разі наявності необхідних матеріалів щодо проведення досліджень на можливу бластомогенність, виконаних на лабораторних теплокровних тваринах (миші, щури, кролі, собаки та деякі ін.).

### **1. Основні принципи відбору та характеристика лікарських засобів для проведення експериментальних досліджень на канцерогенність**

У всіх випадках на початкових стадіях доклінічного вивчення нового ЛЗ є необхідним:

- аналітичне вивчення даних літератури про подібний хімічний клас препарату;

- визначення його фізико-хімічних властивостей та складу лікарської форми, що рекомендується;

- оцінка способу застосування ЛЗ у клініці;
- експертний аналіз іншої інформації.

Усі ЛЗ, які підлягають обов'язковій оцінці канцерогенної небезпеки для людини (на підставі аналізу інформації або даних експериментальних досліджень), поділяються на:

- принципово нові, які не мають хімічних аналогів;
- відтворені у відомому хімічному ряду;
- нові ЛЗ, створені за аналогами відомих хімічних структур;
- оригінальні ЛЗ за індивідуальною структурою, яку можна віднести до відомого хімічного ряду.

При вирішенні питання про тестування на канцерогенність у хронічному експерименті та визначення черговості досліджень необхідно керуватись наступними принципами.

1. Обов'язковому тестуванню повинні підлягати синтезовані лікарські речовини, які рекомендуються:

- як лікувальні, лікувально-косметичні, репелентні засоби та контрацептиви, особливо ті, що рекомендуються для вживання протягом всього життя тривалими (понад 15 днів) повторними курсами;
- для використання без призначення лікаря;
- для застосування у педіатричній практиці;
- для лікування вагітних жінок та у період лактації при терапевтичних захворюваннях.

2. Рішення про доцільність дослідження на канцерогенну активність приймається Державним фармакологічним центром МОЗ України у випадках, коли ЛЗ призначений для лікування злоякісних новоутворень у дітей при одноразовому або короткостроковому застосуванні курсами (до 14 днів), які не повторюються.

3. Тестування на канцерогенність не обов'язкове для ЛЗ, які пропонуються:

- для лікування злоякісних новоутворень у дорослих;
- для лікування захворювань, що становлять безпосередню загрозу для життя;
- відтворених аналогів зарубіжних ЛЗ, якщо в літературі є достатньо обґрунтовані свідчення про відсутність у них потенційних канцерогенних властивостей.

Критеріями добору для встановлення першочерговості досліджуваних ЛЗ, перелічених у пп. 1 та 3, можуть слугувати:

- структурна схожість з відомими канцерогенами, мутагенами, тератогенами або їх метаболітами;
- наявність даних, що свідчать про канцерогенні властивості аналогів за структурою, які застосовувались у клінічній практиці;
- наявність цитостатичних, алкілюючих, гормоноподібних, рістстимулюючих властивостей;
- дані про позитивні реакції у короткострокових тестах на мутагенність (проба Еймса, метод хромосомних аберацій або здатність до ковалентного зв'язування із ДНК та інші);
- недостатні відомості про канцерогенність ЛЗ для експериментальних тварин у раніше проведених дослідженнях.

Лікарські засоби, зазначені у пп. 1 та 2, при наявності одного з вищезазначених критеріїв підлягають обов'язковому тестуванню на канцерогенність. Слід зазначити, що при доклінічному дослідженні дозволяється використовувати ряд короткострокових тестів, за допомогою яких ЛЗ перевіряється на мутагенність. Навіть у разі позитивного (що виключає мутагенну дію) завершення цих випробувань, новий ЛЗ підлягає вивченню на канцерогенну активність на тваринах при дотриманні всіх нижчезазначених вимог. Лише у випадках, коли ЛЗ за жодним критерієм не підпадає під вимоги до речовин, які підлягають обов'язковому першочерговому дослідженню на канцерогенність, Державний фармакологічний центр може дати дозвіл на клінічні випробування на підставі коротко- та середньострокових тестів [2, 10, 11]. Якщо лікарська форма складається з

кількох інгредієнтів, випробуванню на канцерогенність підлягає комплекс у цілому, а в разі його канцерогенності проводиться аналогічне дослідження окремих складових. Допоміжні речовини, які входять до складу ЛЗ (стабілізатори, розчинники, наповнювачі) і не мають дозволу на використання у медицині, потребують окремої для кожної з них перевірки на канцерогенність.

## **2. Вимоги до проведення експериментальних досліджень на визначення канцерогенності речовини**

### ***2.1. Добір експериментальних тварин***

При плануванні дослідження щодо добору тварин слід керуватись такими критеріями:

- доступність;
- вартість;
- чутливість до канцерогенів;
- стабільність реакцій;
- схожість з людиною за метаболізмом та характером реакцій на вплив шкідливих речовин.

Доцільно віддавати перевагу тим тваринам, тривалість життя яких дозволяє простежити дію ЛЗ до їх природної загибелі.

Найчастіше у хронічному експерименті на канцерогенність використовують два види тварин обох статей, як правило, це миші та щури. Проте, які б тварини не планувались для дослідження, не лінійні чи лінійні, бажано мати таку інформацію про особливості їх існування:

- середня тривалість життя;
- стійкість до інфекцій;
- частота спонтанних пухлин;
- видова чутливість до канцерогенних речовин.

У тому випадку, коли передбачається використовувати інші види тварин (собаки, мавпи, кролі, ховрахи), другим видом, як правило, повинні бути миші або щури. Останні можуть бути імбредними або неімбредними, але з низькою варіабельністю частоти спонтанних пухлин. Перевагою імбредних тварин є стабільність та передбачуваність їх реакцій на канцерогенні речовини, що дає можливість зменшити імовірність хибних результатів.

Дослідження рекомендується починати на тваринах віком 1,5–3 місяці або, за можливості, одразу після того, як їх відлучили від матері (маса мишей в останньому випадку повинна становити 16–18 г, щурів – 80–100 г).

Кількість тварин повинна бути такою, щоб можна було отримати статистично вірогідні результати. У кожній дослідній групі має бути не менше 50 тварин кожної статі, при цьому слід зазначити, що самців і самиць необхідно утримувати окремо. На випробування однієї речовини при одному шляху введення та двох дозах потрібно не менше, ніж 600 тварин (200 мишей та 200 щурів у піддослідних групах та 200 тварин у контролі).

Якщо одночасно досліджується декілька речовин, кількість тварин контрольної групи завжди повинна бути ідентичною такій самій у дослідній групі, але не менше 50 тварин. При одночасному дослідженні кількох речовин вона збільшується і становить  $50 \cdot \sqrt{n}$ , де  $n$  – кількість груп [1].

У разі оцінки гормональних препаратів (наприклад, контрацептивів) тестування на канцерогенність рекомендується проводити також на великих тваринах – собаках або мавпах. Період спостереження збільшується до 7–10 років. У цьому випадку у Державний Фармакологічний центр МОЗ України кожні 2 роки подаються етапні проміжні звіти про стан піддослідних тварин.

Наявність контрольної групи є обов'язковою умовою у всіх випадках, навіть коли онкологічні характеристики для дослідних тварин добре відомі, бо спектр та частота спонтанних пухлин з часом можуть мінятись навіть у високо імбредних ліній. Контрольні та піддослідні тварини повинні бути одного віку, отримані одночасно з одного розплідника.

У разі введення ЛЗ у спеціальному розчиннику необхідний додатковий контроль з групи тварин, які повинні отримувати розчинник тим же шляхом, що і тварини дослідної групи.

Дослідні та контрольні тварини повинні утримуватись за однакових умов, на повноцінному раціоні, стандартизованому за складом вітамінів та мікроелементів, і проходити один і той же період карантину.

Всі тварини дослідних та контрольних груп мають бути промарковані і зареєстровані в протоколі досліджень. Тривалість дослідження визначається схемою вивчення конкретного ЛЗ. Бажано, щоб дослідження тривало до повного вимирання піддослідних тварин. Але в деяких випадках, залежно від конкретного ЛЗ, тривалість дослідження може визначатися рекомендаціями [7], згідно з якими вона може бути для щурів 130 тижнів, для мишей – 120, для ховрахів – 100 тижнів. Дослід може бути закінчений тоді, коли у контрольній групі залишилися живими 25% тварин або у дослідних групах виявлено понад 80 % тварин з пухлинами.

Слід відзначити, що питання про закінчення досліджень може бути вирішеним наприкінці експерименту окремо для самиць та самців в залежності від отриманих результатів.

## **2.2. Визначення дози препарату**

Для вивчення канцерогенності ЛЗ, як правило, використовують дві дози.

Доведено, що при тестуванні найбільш виражений канцерогенний ефект спостерігається при використанні максимально переносимої дози (МПД).

Відповідно до міжнародних вимог за МПД слушно вважати максимальну дозу, яка не призводить до загибелі тварин від токсичної дії і спричиняє у субхронічному експерименті гальмування зростання маси тіла не більше як на 10% порівняно з контролем.

Максимальна доза перебуває на рівні  $LD_{16}$ , яка визначається у гострому досліді. Наступні дози мають бути нижчими ніж МПД і становити  $1/30$  і  $1/50$  від  $LD_{50}$ .

Визначення МПД проводиться на кожному виді тварин обох статей, при кожному шляху введення ЛЗ.

Методичні підходи до визначення МПД при проведенні тестування хімічних та фармакологічних речовин викладені у спеціальній літературі [12, 13].

Контрольним тваринам вводять розчинник.

Збільшення МПД під час хронічного досліді є неприпустимим.

Згідно з пропозиціями МАВР, під час дослідження введення ЛЗ може тривати лише певний час, який для щурів становить 108 тижнів, для мишей – 104, для ховрахів – 90 тижнів.

## **2.3. Шляхи введення лікарських засобів**

Плануючи шляхи введення ЛЗ у досліді, слід враховувати, які способи застосування та шляхи введення рекомендуються для його використання у медичній практиці. Методи введення ЛЗ у досліді мають бути відповідними до методів введення в клініці.

Шляхи введення досліджуваних речовин можуть бути різними: пероральний, нашкірний, внутрішньошкірний, підшкірний, внутрішньом'язовий, внутрішньовенний, внутрішньоочеревинний, інгаляційний, внутрішньотрахеальний, внутрішньоартеріальний, трансплацентарний, внутрішньоочний, введення в пряму кишку та ін.

При вивченні канцерогенності ЛЗ, як правило, використовуються два шляхи введення.

Вибір методу введення ЛЗ залежить від його фізико-хімічних властивостей (агрегатного стану, розчинності), фармакокінетики та способу застосування. У всіх випадках рекомендується одним із шляхів введення використовувати внутрішньоплунковий. У тих випадках, коли ЛЗ застосовується тільки внутрішньоплунково, досить обмежитись одним шляхом введення.

**2.3.1. Пероральне введення.** Це найбільш поширений шлях застосування ЛЗ, і тому його визнано найбільш адекватним для більшості речовин, що вивчаються. Останні вводяться з

питною водою та іншими речовинами, продуктами харчування або через шлунковий зонд. Як шлунковий зонд може бути використана гумова трубка діаметром 2–3 мм. Зручно також користуватись металевим зондом, виготовленим з голки для шприца. Для цього гострий кінець голки сточують і на нього напаяють оліву. Виготовлений таким чином зонд дугоподібно вигинають під кутом 30 градусів. Перед введенням у шлунок тварини зонд одягають на шприц. Як правило, процедура введення зонду не супроводжується ускладненнями. Але при проведенні її слід додержуватись обережності, щоб не травмувати слизових оболонок. Необхідно пильно стежити за тим, щоб оліва не мала гострих виступів. Введення ЛЗ через шлунковий зонд дозволяє проводити більш точно його дозування. Зондом доцільно вводити речовину через добу. Якщо через зонд вводиться речовина, не розчинна у воді, її змішують з рідкими харчами, крохмалем, готують емульсії або суспензії. Загальний об'єм рідини, яка вводиться, не повинен перевищувати для мишей – 0,5 мл, для щурів – 2 мл. Частота введення досліджуваних речовин повинна бути наближена до частоти введення ЛЗ хворим. Найраціональнішим є 3-разове вживання на добу або 5-разове при низькому рівні кумуляції речовини.

**2.3.2. Парентеральні шляхи введення (підшкірний, внутрішньошкірний, нашкірний, внутрішньом'язовий, внутрішньоочеревинний шляхи та ін.).** Ці способи введення адекватні шляхам надходження ЛЗ у організм людини, виключаючи внутрішньоочеревинний, який не має широкого застосування у медичній практиці. Перевагою парентеральних шляхів введення є простота, точність дозування речовини, можливість отримання місцевого та системного ефектів. Частота введення лікарських препаратів не повинна перевищувати 1–2 рази на тиждень. Для ін'єкцій готують розчин речовини або суспензію у воді, крохмалі, рослинному маслі, гліцерині. При підшкірному застосуванні досліджуваної речовини загальний об'єм рідини, яка вводиться, не повинен перевищувати: для щурів 1–2 мл, для мишей – 0,2 мл; при внутрішньом'язовому: для щурів – 0,5 мл, для мишей – 0,2 мл; при внутрішньоочеревинному: для щурів – 2 мл, для мишей – 0,5 мл.

**2.3.3. Нашкірне тестування.** Цей спосіб поширений для випробування тих лікарських речовин, які використовуються у клініці у вигляді аплікацій на шкіру та слизові оболонки, а також для змащування шкіри. Перевага у цих дослідженнях надається мишам, але можуть бути використані і кролі. Щури, враховуючи відносно резистентність їх шкіри до індукції пухлин, для таких експериментів не придатні. Рекомендується використовувати мишей гібридів першого покоління (C57BlxСВА), а також C57Bl, СВА. Можливе також використання неінбредних мишей. Нанесення ЛЗ на шкіру слід проводити 2–3 рази на тиждень. У разі необхідності, як розчинник використовується ацетон та диметилсульфоксид. Речовина наноситься на заздалегідь вистрижену від шерсті шкіру міжлопаткової області за допомогою піпетки (якщо це миші) або на шкіру вуха (якщо дослід проводиться на кролях). Щоб утримати на шкірі піддослідних тварин ЛЗ, підбирають в'язкий за фізичними властивостями та нейтральний розчинник. При відростанні шерсті проводять повторні стрижки. Розрахунок дози речовини проводять, виходячи з ваги краплі та числа крапель у 1 мл розчину.

**2.3.4. Внутрішньотрахеальне введення.** Використовується тоді, коли цей шлях є основним шляхом попадання ЛЗ в організм людини. Досліди можуть проводитись на щурах, ховрах та мишах. Позитивною стороною при використанні щурів та ховрахів є те, що в них рідко спостерігаються спонтанні пухлини легень. Але запальні захворювання легень у щурів можуть внести труднощі у проведення довгострокового хронічного експерименту. Використовуючи мишей, слід пам'ятати про можливість появи у них спонтанних пухлин легень (найчастіше аденом) і необхідність враховувати її при аналізі результатів досліджень в цілому.

Інстиляцію речовин у легені можна проводити у вигляді водних розчинів або суспензій чи аерозолів. Можливе використання різних колоїдних розчинів білка. Для більшої тривалості перебування речовини у легенях рекомендується до розчину (суспензії) додавати невелику частину інертної речовини, яка є в переліку наповнювачів для ЛЗ.

Інтратрахеальне введення ЛЗ здійснюється під легким ефірним наркозом або після парен-терального введення барбітуратів. Тварина може бути фіксована на операційному столику для дрібних тварин, у спеціальному пеналі або підвішена на штативі за передні зуби. Рот розкривають пінцетом, витягають язика і у ротову порожнину вставляють вушну лійку, через яку освітлюють вхід у гортань за допомогою отоларингологічного лобного рефлектора. Затуплену на кінці голку під візуальним контролем вводять у трахею. Свідченням правильного її введення є дихання тварини через голку. Підготовлений для дослідження ЛЗ набирають в необхідній кількості у туберкуліновий шприц, залишивши над ним 0,1–0,2 мл повітря. Речовину швидко вводять у легені, а за нею – повітря, що залишилось у шприці.

При застосуванні ефірного наркозу може бути використана конусоподібна металева лійка, що горизонталі розділена металевою сіткою. На сітці з боку звуженої частини лійки кладеться вата, на яку дозовано за допомогою крапельниці з вузьким отвором, розташованої на флаконі з медичним ефіром, наносяться 1–2 краплі ефіру.

ЛЗ слід вводити 1–2 рази на місяць по 0,2–0,5 мл щурам та ховрахам, по 0,05–0,1 мл – мишам. Використання інгаляційних камер можливе тільки за умови систематичного об'єктивного контролю концентрацій речовини. У всіх випадках необхідне проведення відповідних контрольних експериментів.

**2.3.5. Трансплацентарний метод.** Використовується у тих випадках, коли препарат розрахований для вживання вагітним жінкам та для лікування дітей. Схема тестування включає введення ЛЗ вагітним самицям, починаючи з 2–15 дня вагітності (1-й день вагітності визначається за вагінальними мазками), і триває в період лактації, а після відлучення молодих тварин починається введення їм препарату протягом 24-х місяців.

## *2.4. Патоморфологічне дослідження експериментального матеріалу*

Після початку експериментальних досліджень всі загиблі та забиті тварини, згідно зі схемою проведення досліду, наведеною у табл. 1, підлягають патологоанатомічному дослідженню. Для запобігання штучного скорочення тривалості експерименту слід не допускати надмірного забою тварин і вдаватися до цього лише у тих випадках, коли об'єктивні дані свідчать про те, що тварина не проживе довше однієї доби.

Перед розтином визначається маса тварини, проводиться ретельний зовнішній огляд та пальпаторне дослідження, які дозволяють встановити ступінь виснаження, наявність деформацій будь-яких частин тіла, збільшення або відхилення від норми з боку лімфатичних вузлів, наявність підшкірних пухлин та інші патологічні зміни.

Після розтину візуально констатується наявність чи відсутність рідини у черевній та грудній порожнинах, оцінюється її кількість, колір, ступінь прозорості, запах. Далі вивчається стан розташованих у цих порожнинах органів. Звертається увага на розмір, форму, колір, взаєморозташування органів та інші особливості. Всі органи, незалежно від того, визначені в них чи ні макроскопічні зміни, повинні бути зафіксовані у 10% розчині формаліну. Гістологічному дослідженню підлягають шматочки тканин та органів, у яких при візуальному вивченні були помічені зміни, а також всі пухлини. Обов'язковим є гістологічне дослідження печінки, нирок, селезінки, легенів, головного мозку, гіпофізу, ендокринних залоз. Парні органи досліджуються обидва.

Якщо у тварин збільшені печінка, селезінка, лімфатичні вузли, і це дає підозру на лейкоз, необхідно взяти для гістологічного дослідження кістковий мозок (зі стегнової кістки). Архівний патоморфологічний матеріал (фіксовані тканини та органи, виготовлені блоки, гістологічні препарати) повинен зберігатись після подання звіту про результати проведених досліджень на канцерогенність не менше, як 5–8 років.

Об'єктивним свідченням патоморфологічних досліджень є протоколи розтину, які заводяться на кожну із загиблих та забитих тварин. В них зазначаються дата розтину, паспортні дані (номер досліду, назва лікарської речовини, доза, що досліджується, група, шлях введен-

ня, вид, лінія, стать тварини, вік на момент смерті, тривалість впливу речовини, загальна тривалість досліду від початку введення до смерті тварини, дані розтину). Перераховуються органи, які були взяті для гістологічного дослідження, верифікація виявлених пухлинних і непухлинних процесів. Слід зазначити, що при гістологічній діагностиці пухлин лабораторних тварин, необхідно керуватись класифікацією пухлин лабораторних тварин, яка викладена у виданні МАВР (1973–1982 pp.) «Pathology of Tumours in Laboratory Animals».

### **2.5. Основна документація дослідження та вимоги до її оформлення**

Первинним матеріалом дослідження та всієї подальшої роботи є протоколи експерименту. На кожний ЛЗ, який підлягає дослідженню, заводиться робочий журнал. У ньому вказується прізвище експериментатора, назва лабораторії, установи, де проводиться випробування на канцерогенність, відомості про ЛЗ: назва, формула, джерело надходження, дата виготовлення та наявність домішок, склад препаративної форми; дані про розчинники, які використовувались в експериментах, концентрації ЛЗ, методи приготування розчину; кількість розчину, який готується кожного разу, рН розчину, його стійкість, дата приготування, кошторис затрат за темою при дослідженні ЛЗ.

Наводяться також вичерпні відомості про тварин, на яких проводиться експеримент: вид, лінія, кількість взятих для досліду тварин, дата народження або надходження з розплідника (власне розведення, розплідник), інбредність, принцип розподілу по групах (випадковий, рандомізований за спеціальними таблицями та ін.).

Обов'язково реєструється дата першого введення ЛЗ тваринам, шляхи введення, частота, доза, дата останнього введення, чи були перерви при введенні та зміни дозування. Слід зазначити, що всі тварини (дослідні та контрольні) повинні мати індивідуальні номери, результати індивідуального зважування та спостереження за ними. Відмічаються виявлені зміни, зовнішній вигляд, наявність пухлин та ін., дата загибелі або забою кожної тварини. Зважування тварин необхідно проводити перед першим введенням ЛЗ, кожного тижня протягом першого місяця, один раз у два тижні протягом другого місяця, потім щомісячно та перед розтином.

### **3. Оцінка результатів дослідження на канцерогенність**

Після закінчення досліджень всі отримані дані, які можуть свідчити про наявність чи відсутність канцерогенності ЛЗ, а саме, результати гістологічного дослідження, відомості про виживання тварин, зміна маси тварин, середній латентний період виникнення пухлин та ін. зводяться у таблиці (додаток, таблиці 1–4).

При виборі методів статистичної обробки результатів випробування ЛЗ слід використовувати як загально визнані, так і інші рекомендовані методичні підходи [4], виходячи з конкретних завдань, умов дослідів та отриманих на певних етапах даних.

Головним критерієм канцерогенного ефекту є розвиток пухлин під впливом ЛЗ, що вивчається. Аналізуючи отримані дані (таблиці 2–4), необхідно, перш за все, порівнювати частоту, локалізацію пухлин, та час їх появи у дослідних та контрольних групах тварин, а також проводити порівняння із показниками спонтанних новоутворень у тварин цієї лінії або популяції розплідника ( історичний контроль).

Таким чином, показниками канцерогенної активності речовин є:

- частота пухлин, індукованих ЛЗ;
- збільшення рівня спонтанних новоутворень;
- скорочення латентного періоду;
- середня кількість пухлин на одну тварину (коефіцієнт мпожинності);
- співвідношення доброякісних та злоякісних пухлин.

Визначення можливості індукції пухлин ЛЗ проводиться за допомогою аналізу гістоморфологічного спектру виявлених новоутворень у дослідних та контрольних групах. Визначається



загальна частота індукованих та спонтанних пухлин. У разі відсутності чітко визначеного специфічного ефекту аналізується кількість пухлин.

Частота пухлин визначається, як відсоток тварин з пухлинами від загальної кількості тварин в групі. Загибель тварин від інтеркурентних захворювань може привести до помилок у оцінці цього показника, а також до його заниження. Щоб уникнути цього, розраховують частоту пухлин від ефективного числа тварин. За ефективне число береться кількість тварин, які вижили до появи першої пухлини у групі. Коли порівнюються кілька груп, за ефективне число береться кількість тварин, які вижили до появи першої пухлини серед усіх груп.

Визначення латентного періоду проводиться двома шляхами: експериментальним та розрахунковим. Експериментально латентний період визначається в результаті виявлення новоутворень при серійних забоях тварин у різні строки хронічного експерименту. Частота пухлин у таких експериментах визначається, як доля тварин з пухлинами до кількості забитих тварин на цей строк. Після цього будується графік залежності частоти пухлин від часу, який і дозволяє встановити середній латентний період. Це найбільш точний метод, але він потребує наявності у експерименті значної кількості тварин.

Розрахунковий шлях дозволяє встановити латентний період за допомогою графіку залежності кумулятивної частоти пухлин від часу, який пройшов з початку введення речовини [4, 9]. У світовій практиці поширено застосування комбінації цих підходів шляхом введення до схеми експерименту проміжного забою тварин на 13-му місяці експерименту з метою виявлення пухлин або передпухлинних станів. Завдяки цьому можливе виявлення найбільш небезпечних канцерогенів з коротким латентним періодом. В разі відсутності виявлення пухлин на 13-му місяці експерименту латентний період визначають розрахунковим методом.

Коефіцієнт множинності пухлин визначається, як кількість пухлин на одну тварину. Він може свідчити про багатофакторність канцерогенного ефекту.

Аналіз отриманих результатів потребує визнання адекватності проведеного експерименту рекомендаціям МАВР. Вважається, що дослід не може бути визнаний адекватним, якщо смертність тварин у контрольних та дослідних групах перевищує 50% у віці 104 тижні у щурів, 96 тижнів – у мишей та 80 тижнів у ховрахів [7].

Згідно рекомендацій МАВР, речовина визнається канцерогенною, якщо навіть у одній з дослідних груп є статистично вірогідне перевищення частоти пухлин порівняно з контролем. При цьому необхідно враховувати загальний відсоток пухлин, відсоток пухлин за окремими локалізаціями, величину середнього латентного періоду появи пухлин.

На підставі цих рекомендацій МАВР Державний фармакологічний центр МОЗ України пропонує оцінювати результати канцерогенної дії ЛЗ згідно з 4 категоріями, виходячи з таких принципів.

1. Достатні докази канцерогенності визначаються тоді, коли ЛЗ викликає 80–85 % злоякісних та доброякісних пухлин у багатьох видів чи ліній дослідних тварин, або у численних експериментах при використанні різних шляхів введення чи застосуванні декількох доз. Вони достатні і тоді, коли спостерігається незвичайний ступінь канцерогенності стосовно частоти, локалізації, типу, середнього латентного періоду виникнення пухлин або віку тварин, у якому вони з'явилися.

2. Обмежені докази канцерогенності встановлюються у тому разі, коли результати дослідів хоча і вказують на канцерогенний ефект, але є деякі обмеження. До них відносяться: а) тестування, проведене на одному виді, лінії тварин; б) використовувались неадекватні дози, недостатня кількість введень препарату, невелика кількість тварин, що вижили, їх було дуже мало, результати дослідів викладені незадовільно; в) індуковані пухлини часто зустрічаються спонтанно, їх важко визначити як злоякісні чи доброякісні на підставі тільки одних гістологічних критеріїв (аденоми та аденокарциноми легень, пухлини печінки, які виникають у деяких ліній мишей).

3. Невизначеність ефекту встановлюється у разі отримання в експерименті неадекватних даних. Це буває у тому разі, коли допущені серйозні якісні, або кількісні помилки у плануванні

та проведенні експерименту, внаслідок чого результати тестування не можуть бути певно визначені, як доказ наявності чи відсутності канцерогенності.

4. Відсутність доказів констатують тоді, коли результати декількох адекватно проведених експериментів свідчать про те, що у рамках цих дослідів речовини, які випробувались, не виявили канцерогенної активності.

Треба мати на увазі, що категорії «достатні» та «обмежені» докази відображають лише вірогідність експериментальних даних відносно канцерогенності ЛЗ або його складових.

Слід також зазначити, що визначаючи можливість канцерогенної небезпеки ЛЗ, здатного до індукції пухлин у експерименті на тваринах, не можна виходити з принципу його заборони. Згідно з даними МАВР, для багатьох хімічних речовин є достатні докази їх канцерогенності для тварин, у той час як дані відносно їх канцерогенності для людини недостатні або не існують. Саме тому треба завжди підходити до оцінки ступеню ризику та терапевтичної цінності кожного ЛЗ, враховуючи спосіб його застосування, розповсюдженість використання серед населення, можливість отримання без призначення лікаря та ін.

Результати дослідження оформляються у вигляді наукового звіту відповідно до діючого ДСТ і надсилаються до Державного фармакологічного центру МОЗ України.

Остаточне рішення про достатність результатів тестування на канцерогенність ЛЗ та дозвіл на його клінічне випробування приймає Державний фармакологічний центр МОЗ України.

## Література

1. Методические рекомендации по исследованию канцерогенных свойств химических веществ и биологических препаратов в хронических опытах на животных.– М., Л., 1981.– 45 с.
2. Методичні рекомендації по представленню документації на лікарські засоби у Фармакологічний комітет МОЗ України.– К., 1993.– 40 с.
3. Бабаян З.А., Уткин О.Б. Основные положения апробации лекарственных средств в СССР и зарубежных странах.– М.: Медицина.– 188 с.
4. Турусов В.С., Парфенов Ю.Д. Методы выявления и регламентирования химических канцерогенов.– М.: Медицина.– 147 с.
5. Цапенко Б.Ф., Бойм Т.М., Осиньковская Н.Д., Рубенчик Б.Л. Изучение канцерогенной активности некоторых отечественных лекарственных препаратов//Эксперим. онкол.– 1986.– Т.8, №3.– С. 75–76.
6. Carcinogenicity testing of potencial medicines – challenges and changes 7 March 1996. Conferece documentation.– London: I.B.C UK Conferences LTD, 1996.
7. IARC. Monographs on the evaluation of carcinogenic of chemicals to humans. Suppl. 2. Long-term and short term screening assays for carcinogens: a critical appraisal.– Lyon, 1980.– 462 p.
8. Руководящие методические материалы по экспериментальному и клиническому изучению новых лекарственных средств.– М., 1975.– 143 с.
9. Методические рекомендации по изучению комплексного действия на организм канцерогенных углеводов в окружающей среде.– К., 1983.– 12 с.
10. Ito N., Shirai T., Hasegawa R. Medium-term bioassays for carcinogens// Mechanism of carcinogenesis in risk identification/Ed. H.Vanio, P.N.Magee, D.B.McGregor & A.J.Michael.– Lyon: IARC, 1992.– P. 353–388.
11. Nedopitanskaya N.N., Bagley E.A., Kornuta N.A. Use of Medium- and Short-term Tests for the Evaluation Carcinogenic Properties//Toxicol. Lett.– 1995.– Suppl. 1/78.– P. 60.
12. Гацура В. Е. Методы первичного фармакологического исследования биологически активных веществ.– М.: Медицина, 1974.– 142 с.
13. Саноцкий Й.В. Методы определения токсичности и опасности химических веществ.– М.: Медицина, 1970.– 120 с.

## ДОДАТОК

Таблиця 1

**Схема експерименту з вивчення канцерогенного впливу нового ЛЗ з широким спектром дії**

Групи	Кількість тварин	Стать, самиці/самці	Доза на тварину	Кількість введень	Спосіб введення
<b>Миші</b>					
1 (контроль)	120	70/50	–	–	інтактні
2 (контроль)	120	70/50	Розчинник ЛЗ 0,5 мл/тварину	протягом 2 років	розчинник ЛЗ нашкірно
3 (дослід)	175	100/75	1/30 ЛД <sub>50</sub>	протягом 2 років	нашкірне з розчинником
4 (дослід)	175	100/75	1/10 ЛД <sub>50</sub>	протягом 2 років	з харчами або питною водою
5 (дослід)	175	100/75	1/50 ЛД <sub>50</sub>	протягом 2 років	з харчами або питною водою
<b>Щури</b>					
1 (контроль)	60	30/30	–	–	інтактні
2 (контроль)	60	30/30	Розчинник ЛЗ 0,5 мл/тварину	1 раз/міс протягом 2 років	підшкірне розчинник ЛЗ
3 (дослід)	100	50/50	1/50 ЛД <sub>50</sub>	1 раз/міс протягом 2 років	підшкірне з розчинником
4 (дослід)	100	50/50	1/10 ЛД <sub>50</sub>	3 рази/тижд. протягом 2 років	з харчами або питною водою
5 (дослід)	100	50/50	1/20 ЛД <sub>50</sub>	3 рази/тижд. протягом 2 років	з харчами або питною водою

Таблиця 2

**Вживання піддослідних тварин у процесі вивчення канцерогенної дії ЛЗ**

Рік, дата, час від початку дослідів (міс)	Вид тварин та % виживання в групах				
	Група 1	Група 2	Група 3	Група 4	Група 5
	стать %	стать %	стать %	стать %	стать %

Таблиця 3

**Результати патологоанатомічного дослідження тварин з хронічного дослідів на визначення канцерогенності ЛЗ**

Вид тварин, група, стать	Латентний період виникнення пухлини (міс)	Загальна кількість пухлин у тварини	Локалізація пухлин, кількість	Патогістологічний діагноз	Характер пухлинного росту		Супутні патологічні процеси в органах, тканинах
					Добро-якісні	Зло-якісні	
1	2	3	4	5	6	7	8

Таблиця 4

**Основні характеристики росту пухлин у експериментальних тварин в процесі дослідження на канцерогенність ЛЗ**

Вид, серія, група	Кількість тварин у групі	Ефективне число*	Латентний період (міс.)		Сумарна доза препарату на тварину	Кількість тварин з пухлинами		Коефіцієнт множинності
			мін.	серед.		абс.	%	
1	2	3	4	5	6	7	8	9

Примітка: \* ефективне число – кількість тварин, які дожили до появи першої пухлини в групі, або серед усіх груп, якщо вони порівнюються і аналізуються спільно.

## МОРФОЛОГІЧНІ ДОСЛІДЖЕННЯ НА ЕТАПІ ДОКЛІНІЧНОГО ВИВЧЕННЯ ЛІКАРСЬКИХ ЗАСОБІВ

Матвієнко А.В.  
Степанова Л.В.

### Вступ

Необхідним етапом вивчення біологічної реакції організму тварин на дію лікарських засобів (ЛЗ) є патоморфологічні дослідження. Це потребує відповідної кваліфікації дослідника, якості тварин, що використовуються в експерименті, дотримання всіх правил і вимог з техніки забору та обробки досліджуваних об'єктів.

Тестування ЛЗ виконують на таких видах ссавців: білі миші, білі щури, кролі, мурчаки, собаки. Для цього необхідно мати достатню кількість тварин, яка необхідна для проведення статистичної обробки морфологічного матеріалу (не менше 6 дрібних та 3 великих тварин). Тестування проводять на статевозрілих, здорових ссавцях обох статей.

Результати впливу ЛЗ оцінюють після макроскопічного огляду та мікроскопічного дослідження органів експериментальних та контрольних тварин.

У даних рекомендаціях викладені етапи патоморфологічних досліджень тварин після проведеного токсикологічного експерименту [1].

1. При вивченні гострої токсичності загиблих тварин і тварин, що вижили, після евтаназії в кінці експерименту піддають розтину. Проводять макроскопічний огляд, органи зважують, досліджують гістологічну структуру органів і тканин з явними макроскопічними змінами.

II. При вивченні підгострої токсичності:

- тварини, загиблі протягом експерименту, та тварини, що перебувають в агональному стані, підлягають розтину, макроскопічному огляду та опису, органи їх зважують і досліджують гістологічно;
- наприкінці досліду всіх тварин, що вижили, піддають евтаназії, розтинають, описують макроскопію, органи зважують;
- гістологічному дослідженню піддають органи всіх контрольних тварин, а також тих, що отримали максимальну дозу досліджуваного препарату;
- органи і тканини тварин інших груп піддають гістологічному вивченню за наслідками макроскопічних змін в органах.

III. При вивченні хронічної токсичності:

- усі загиблі тварини підлягають розтину, макроскопічному опису, органи їх зважують та вивчають за допомогою гістологічних методів;
- агонізуючих тварин піддають евтаназії і розтинають, описують макроскопію, органи та тканини вивчають за допомогою гістологічних методів;
- решту тварин, що вижили, також піддають евтаназії, розтинають, проводять макроскопічний опис, органи їх зважують;
- гістологічному дослідженню підлягають органи тварин контрольної групи та групи тварин після дії максимальної дози ЛЗ;
- органи тварин інших груп вивчають за допомогою гістологічних методів після виявлення макроскопічних змін в органах та органах-мішенях.

На початку кожного експерименту з протоколу гострої токсичності та інших джерел згідно з Технічним завданням заповнюють Карту експерименту (додаток 1). Керівник технічного завдання повинен визначити графік проведення експерименту та нумерацію тварин у групі. У випадку зміни графіка чи схеми експерименту слід повідомити про це у відділ патоморфології.

Інструменти для розтину, фіксуєчі рідини і відповідну документацію потрібно приготувати до початку евтаназії. Інструменти для розтину підбирають відповідно до типу тварин. Розтин розпочинають одразу після евтаназії тварини. Процедури макроскопії та розтину стандартизовані незалежно від виду піддослідної тварини. Згідно з формою звіту про патологічні дослідження (додаток 2) необхідні такі дані: номер тварини, вид, вік, стать, доза ЛЗ, клінічна історія, дата смерті чи спосіб евтаназії. Всі аномалії та патологічні зміни, виявлені при розтині тварини, потрібно реєструвати у звіті про патоморфологічні дослідження.

Записи в звіті про патоморфологічні дослідження виконує відповідальний лаборант.

Науковий співробітник готує Лист-інструкцію розтину тварини (додаток 3). Тканини та органи, що не досліджуються, потрібно викреслити, а ті, що не вписані – потрібно занести в Лист-інструкцію.

Вирізані шматочки органів розміщують у маркіровані скляні банки з відповідною фіксуєчою рідиною. Фіксовані тканини потрібно зневоднити, просочити парафіном чи целоїдином та виготовити блоки.

Для мікроскопічного дослідження тоненькі зрізи органів необхідно спеціально обробити: забарвити чи провести гістохімічну реакцію, просвітлити та заключити в полістирол чи бальзам. Для вивчення різних компонентів тканин існує безліч методик забарвлення зрізів та гістохімічних реакцій, що використовуються у гістологічній практиці.

## 1. Евтаназія експериментальних тварин

**Евтаназія** – це швидке та безболісне позбавлення життя тварин, що не спричиняє в них тривоги та страху [2–4].

### Основні вимоги до евтаназії

– Основним правилом евтаназії є попередня дія на центральну нервову систему (ЦНС) тварин засобами наркозу з метою відключення їх свідомості і наступним впливом на інші системи організму, що призводить до загибелі тварини. Позбавлення життя тварин шляхом зупинки серця, дихання і т.ін. категорично забороняється.

– Евтаназія проводиться в окремому приміщенні. Не допускається позбавляти життя одних тварин в присутності інших тварин. Винятком є дрібні тварини, коли використовується передозований інгаляційний наркоз.

– Після проведення евтаназії устаткування та приміщення для евтаназії старанно мисться з метою видалення запаху, що залишився.

– Позбавлення життя тварин треба проводити своєчасно – до прояву в них больових відчуттів; у гострому експерименті – до виходу із стану наркотичного сну. В хронічному експерименті тварина лишається життя, коли вона стає нежиттєздатною і починає страждати. Якщо за умов експерименту потрібен деякий час для спостереження за твариною, що має больові відчуття, їй потрібно вводити знеболюєчі засоби.

### 1.1. Евтаназія мишей

1.1.1 Тваринам не дають їжі за 4–6 год до наркозу.

– Тварину виймають з клітки, тримаючи лівою рукою за шкіру потилиці чи правою рукою за хвіст.

– Тварину поміщають в ексикатор, в який кладуть вату, змочену ефіром (ємність ексикатора – 5 л, ефіру – 10 мл).

- Показником початку наркотичного сну при передозованому ефірному наркозі є бокове положення тварини, релаксація м'язів.
- За необхідності продовжувати наркоз, в ексикатор знову кладуть ватку, змочену половинним об'ємом ефіру.

1.1.2 Евтаназію мишей проводять також шляхом дислокації хребців шийного відділу хребта.

- Правою рукою тварину беруть за шкіру в ділянці потилиці, лівою – за хвіст. Різким рухом за хвіст на себе зміщують хребці шийного відділу. Спинний мозок розірваний – тварина мертва.

### **1.2. Евтаназія щурів**

1.2.1 Тваринам не дають їжі за 8–10 год до наркозу ефіром.

- Виймають тварину з клітки за хвіст на секційний стіл.
- Тварину погладжують, заспокоюють.
- Її поміщають в ексикатор, куди спочатку кладуть вату, змочену ефіром (ємність ексикатора – 5 л, ефіру – 10 мл).
- Показником початку наркотичного сну при передозованому ефірному наркозі є бокове положення тварини, релаксація м'язів. Тварина перебуває в ексикаторі після зупинки дихання упродовж 15 хв.
- За необхідності подовжувати наркотичний сон в ексикатор кладуть вату, змочену половинним об'ємом ефіру.

1.2.2 Евтаназія внутрішньоочеревинним введенням 10% розчину тіопенталу натрію.

- Тварині не дають їжі за 8–10 год до наркозу.
- Виймають тварину з клітки за хвіст на секційний стіл.
- Погладжують, заспокоюють тварину.
- Лаборант правою рукою бере за шкіру голови і фіксує голову і передні кінцівки, лівою рукою утримуючи задні кінцівки і хвіст. Тварині надають відповідне положення: головою вниз, обробляють шкіру нижньої частини черева спиртом етиловим, захоплюють її пальцями лівої руки в складку і в основу її вводять голку, з'єднану із шприцом, вводять внутрішньоочеревинно 2 мл 10% водного розчину тіопенталу натрію. Виймають голку й кладуть тварину на лоток. Тварина в стані наркотичного сну через 7–10 хв.
- Роблять розтин шкіри в передній області шиї, перерізають зовнішню і внутрішню сонні артерії.

### **1.3. Евтаназія мурчаків**

- Заспокоюють тварину.
- Лаборант лівою рукою тримає тварину за шкіру потилиці, правою – за шкіру крижів.
- Тварині надають відповідне положення: головою вниз, обробляють шкіру нижньої частини черева спиртом етиловим, захоплюють її пальцями лівої руки, в складку і в основу її вводять голку, з'єднану із шприцом, вводять внутрішньоочеревинно 3 мл 10% водного розчину тіопенталу натрію.
- Тварина в стані наркотичного сну – через 4–6 хв (мигальний рефлекс повік відсутній або не визначається).
- Кладуть тварину на лоток, розтинають шкіру в області передньої поверхні шиї, перерізають зовнішню та внутрішню сонні артерії.

### **1.4. Евтаназія кролів**

- Погладжують, заспокоюють тварину.
- Лаборант лівою рукою тримає її за шкіру потилиці, правою – за шкіру крижів.
- Поміщають тварину в спеціальний дерев'яний станок, голову виводять назовні через отвір, розташований в передній частині станка.

- У крайову вену вуха вводять 2 мл 10% водного розчину тіопенталу натрію.
- Тварина в стані наркотичного сну – через 3–5 хв (мигальний рефлекс повік відсутній, або не визначається).
- Виймають тварину із станка і кладуть на лоток.
- Змочують шкіру водою в ділянці передньої поверхні шиї, розтинають її, перерізають зовнішню та внутрішню сонні артерії.

### **1.5. Евтаназія собак**

- Тварину вигулюють 30 хв.
- Заспокоюють тварину.
- Одягають намордник.
- Фіксують тварину в станку за передні та задні кінцівки за допомогою спеціальних ременів.
- Тварину кладуть на секційний стіл у боковому положенні, тримають за передні та задні кінцівки і одночасно притискують до столу тулуб та голову.
- У латеральну вену гомілки задньої кінцівки вводять 5 мл 10% водного розчину тіопенталу натрію.
- Через 5 хв тварина перебуває в стані наркотичного сну, мигальний рефлекс повік при цьому відсутній або не визначається.
- Виймають тварину зі станка, фіксують її спиною вниз за передні та задні кінцівки.
- Розтинають шкіру передньої поверхні шиї, перерізають зовнішню та внутрішню сонні артерії.

## **2. Процедура розтину і зовнішнього огляду**

Процедура розтину і зовнішнього огляду стандартизована незалежно від виду тварин і їхнього стану (загибла чи піддана евтаназії) [5, 6].

### **2.1. Зовнішній огляд**

- Загальний фізичний стан (зайва маса, недостатня маса, ступінь виснаження, наявність чи відсутність аномалій та ін.).
- Стан шерстяного покриву та шкіри (шерсть гладенька та шовковиста – нормальний стан; кошлата, груба, рідка чи з плішивістю; ушкодження шкіри та місце його розташування).
- Очі (ясні та вологі – нормальний стан; запалення оболонок з виділеннями, тьмяні чи непрозорі – патологічні зміни).
- Рот та губи (рожеві, гладенькі та блискучі – нормальний стан; запалені, з виразками, підвищене слиновиділення, аномалії зубів – патологічні зміни).
- Ніс (гладенький і блискучий – нормальний стан; сухий, вкритий кіркою чи із запаленням, свіжий чи сухий ексудат, чи серозна рідина – патологічні зміни).
- Анальний отвір (маленький, рожевий і щільно закритий – нормальний стан; збільшений, запалений, з виразками, промежина забруднена виділеннями – патологічні зміни).
- Зовнішні статеві органи (у самців: парний набір яєчок, однакових за розміром, крайня плоть нормальних розмірів, без виділень; у самок: розмір зовнішніх статевих органів у межах норми, без виділень, запалень та аномалій).

### **2.2. Розтин тварин**

- Закріплюють тварину на корковому столі чи станку в горизонтальному положенні на спині, змочують водою вентральну поверхню.

- Серединним розрізом від підборіддя до лона розсікають шкіру і відділяють її тупим інструментом від нижче розташованих тканин.
- Перерізають грудні м'язи і відповідні кровоносні судини, видаляють кров.
- Розтинають шию, знаходять підщелепну і привушну слинні залози та регіональні лімфатичні вузли.
- Оглядають ці залози, видаляють їх і поміщають на лоток з фізіологічним розчином.
- Видаляють молочну залозу з прилеглими тканинами, оглядають і поміщають на лоток.
- Серединним розтином від мечоподібного відростка до лона розкривають черевну порожнину, продовжують розтин вправо і вліво від нижніх останніх ребер.
- Відокремлюють підшлункову залозу, селезінку, оглядають їх і поміщають на лоток.
- Сечостатеву систему вивчають залежно від статі: самці – розтинають мошонку, оголюють кожний сім'яний канатик по черзі і відсікають відразу ж над епідидимісом, оглядають їх і кладуть на лоток; відокремлюють простату і сечовий міхур разом, перерізають уретру нижче простати, виймають сім'яний міхурець, відділяють м'яко, оглядають і кладуть на лоток; самки – виділяють сечовий міхур, оглядають і кладуть на лоток; виділяють піхву під шийкою матки, звільняють матку, яєчники від брижів, перерізають фаллопієві (маточні) труби, оглядають і кладуть на лоток.
- Відсікають ліву і праву нирку, надниркову залозу, оглядають і кладуть на лоток.
- Відрізають уперек пряму кишку, якомога нижче, відділяють брижі. Відсікають стравохід над кардіальним сфінктером, виймають шлунково-кишковий (травний) тракт, якщо вказано в Протоколі – оглядають.
- Відділяють шлунок, відрізають дванадцятипалу кишку ближче до затискача пілоричної частини шлунка, відкривають шлунок по великій кривизні, вимивають вміст шлунка фізіологічним розчином, оглядають і кладуть на лоток.
- Відділяють кишечник від брижів.
- Оглядають тонку кишку, відкривають її, якщо потрібно, уздовж. Відбирають по три відрізки довжиною в 1 см від 12-палої, порожньої, клубової кишок і кладуть на лоток.
- Відділяють сліпу кишку, відкривають її, промивають фізіологічним розчином.
- Оглядають ободову кишку, відкривають її, якщо потрібно, уздовж відрізають від неї смужку довжиною 1 см і кладуть на лоток.
- Виймають лімфатичний вузлик брижі, оглядають і кладуть на лоток.
- Виймають печінку, відокремлюють долі, оглядають і кладуть на лоток.
- Піднімають мечоподібний відросток пінцетом, розрізають діафрагму, входять у грудну порожнину і розрізають ребра на відстані 0,5–1 см з обох боків груднини, обережно, щоб не пошкодити тимус.
- Звільняють язик, гортань, щитовидну та паращитовидні залози, трахею, стравохід, серце, легені, тимус, виймають з грудної порожнини.
- Відділяють тимус, оглядають його і кладуть на лоток.
- Перерізають аорту на рівні дуги, виймають, оглядають і кладуть на лоток.
- Відділяють серце, перерізають для цього легеневу артерію, оглядають і кладуть на лоток.
- Відділяють трахею на відстані 5 мм вище бронхіального розгалуження. Відкривають і оглядають її, якщо це потрібно за протоколом. Відрізають частину і кладуть на лоток.
- Відділяють легені, оглядають їх і кладуть на лоток.
- Відрізають другу частину трахеї разом зі щитовидною залозою і кладуть на лоток.
- Відрізають середню частину стравоходу довжиною 0,5–1 см, оглядають і кладуть на лоток.
- Відрізають передню частину язика, оглядають і кладуть на лоток.
- Розрізають шкіру задньої кінцівки, відсікають шматок скелетних м'язів і сідничного нерва і кладуть на лоток.
- Відділяють стегнову кістку, оглядають і кладуть на лоток.
- Відрізають скелетні м'язи з основи черепа і потилиці, щоб звільнити потиличні міщелки і атлант, перегинають голову через пальці, виділяють спинний мозок на рівні з'єднання велико-



го отвору і атланту. Проходять обережно вперед кістяними кусачками, відділяють череп, щоб відкрити оболонку мозку. Голову тримають між великим і середнім пальцями, щоб ніс був направлений на долоні. Піднімають довгастий мозок, щоб оголити черепні нерви, і по черзі відрізають їх, доки мозок не впаде на долоню, оглядають його і кладуть на лоток. Нюхові цибулини мозку потрібно включати, якщо це спеціально необхідно згідно з протоколом дослідження.

– Відділяють гіпофіз від дна порожнини черепа гострим скальпелем, проникнувши через точку мембрану, що покриває турецьке сідло, піднімають гіпофіз на вістря скальпеля, оглядають і кладуть на лоток.

– Відрізають частину торакально-очеревинного хребта довжиною приблизно 1 см, відокремлюють нейтральну дугу, щоб оголити спинний мозок, відрізають зразок і кладуть на лоток.

Суворий порядок дослідження органів може змінюватись у межах окремої системи. Так, для сечостатевої системи при аутопсії не має значення першочерговість виділення органів. Послідовність процедури аутопсії може бути змінена через виявлені ушкодження, наприклад, наявність великого новоутворення в черевній порожнині.

У випадку виявлення аномалій можна взяти додаткові тканини. Про це необхідно зробити відповідні записи в форму Звіту (додаток 2).

Після закінчення розтину лаборант повинен перевірити, щоб усі тканини лежали у відповідних чашках на лотку. Для цього треба назвати помічника (асистенту) всі тканини, що були взяті. Асистент повинен в цей час проставити позначки в клітинках для відповідних тканин в формі Звіту про патоморфологічні дослідження і перевірити згідно з листом інструкції розтину (додаток 3), що всі потрібні тканини взяті. Крім того, перед початком процедури зважування органів необхідно відділити голівку стегнової кістки та приготувати мазок кісткового мозку.

### **2.3. Зважування органів**

– Органи, які потрібно зважити, вказані в листі інструкції розтину, але, зазвичай, це такі органи:

- надниркові залози – ліва та права;
- мозок;
- серце;
- нирки – ліва та права;
- печінка;
- легені;
- яєчники (яєчка) – ліві та праві;
- гіпофіз;
- простата/матка;
- селезінка;
- тимус.

– Кожну тканину потрібно «волого висушити», помістивши її для цього на папір-адсорбент перед зважуванням. Органи слід зважувати відповідно до процедури використання терезів.

- Результати зважування заносяться до Звіту про патоморфологічні дослідження з точністю до десятих часток грама.

- У легені потрібно влити 0,5 мл фіксуючого розчину через трахею.

Якщо сечовий міхур не заповнений сечею, його потрібно також заповнити фіксуючим розчином (кількість фіксуючого розчину залежить від виду тварини).

- Закінчивши зважування, лаборант, який проводив його, повинен підписати форму Звіту про патоморфологічні дослідження та передати лоток з тканинами і заповнену форму керівнику розтину (аутопсії).

### **3. Підготовка об'єктів для заливки в парафін**

Способи забарвлення гістологічних препаратів обов'язково повинні узгоджуватися із способом фіксації об'єкта: кожний вид і якість забарвлення препарату найчастіше пов'язані з вибором того чи іншого фіксатора. Для морфологічних досліджень найчастіше застосовується формалін, що забезпечує порівняно добру фіксацію шматочків тканин і окремих клітин. Для проведення деяких гістохімічних реакцій, які можуть застосовуватися при вивченні окремих ЛЗ, використовуються фіксатор Карнуа, Шабадаш та інші [7, 8].

#### **3.1. Фіксація тканини**

– Відібрані шматочки тканин та органів піддослідних тварин для подальшого морфологічного дослідження потрібно промаркірувати і помістити в фіксуєчий розчин – 10% нейтральний формалін.

– Скляний посуд відповідної ємкості для фіксації тканин і органів потрібно також промаркірувати, заповнити нейтральним формаліном.

– Термін фіксації тканин – 1–5 діб. Показником належної фіксації є рівномірне ущільнення об'єкту з однаковим виглядом як з поверхні, так і на контрольному зрізі.

– Після фіксації органу чи тканини скляний посуд потрібно звільнити від фіксатора, вимити і просушити його.

#### **3.2. Дегідратація (зневоднення об'єктів) і заливка в парафін**

Профіксовані шматочки тканини завтовшки 0,4–0,6 см і відповідно промаркіровані необхідно провести через спирти зростаючої концентрації і залити в парафін.

#### **3.3. Дегідратація об'єктів і заливка в целоїдин (нервова тканина)**

– Скляний посуд відповідної ємкості для фіксації нервової тканини потрібно також промаркірувати і залити 10% нейтральним формаліном. Об'єм фіксуєчої речовини повинен у 20–40 разів перевищувати об'єм шматочків тканини.

– Відібрані шматочки досліджуваних ділянок головного мозку необхідно помістити в 10% нейтральний формалін (пластинки завтовшки 0,5 см).

– Термін фіксації нервової тканини – 5–7 діб.

– Профіксовані і відповідно промаркіровані шматочки нервової тканини проводять через спирти зростаючої концентрації і заливають у целоїдин.

– Контролем ступеня забрудненості робочих спиртів жиром є проба з водою. Якщо при змішуванні (в пробірці) невеликої кількості відпрацьованого спирту (спиртового ряду) з водою з'являється сильне помутніння, такий спирт відразу замінюють новою порцією. Потрібно, щоб спирт з водою зовсім не давав каламуті і тільки після цього можна переміщувати об'єкт у спирт-ефір.

Коли тканини розташовані в скляних ємкостях для проводки, а дані занесено до таблиці, лаборант повинен записати дату початку процесу проводки у відповідний стовпчик форми Звіту про патоморфологічні дослідження на зворотному боці (додаток 2).

### **4. Виготовлення зрізів**

– Виготовлення тонких зрізів спеціально оброблених шматочків органів та тканин, які необхідно дослідити на мікроскопічному рівні, здійснюється за допомогою мікротому.

– Виготовлення заморожених зрізів з фіксованої в нейтральному формаліні тканини здійснюється за допомогою термоохолоджуючого столика [9].

## 5. Забарвлення препаратів

Для вивчення всіх компонентів тканин існує низка методів забарвлення та гістохімічних методик. Більшість загальних методів забарвлення тканин неспецифічні і виявляють різноманітні структури, тоді як гістохімічні реакції визначають окремі хімічні речовини та їх локалізацію.

При дослідженні хронічної токсичності ЛЗ обов'язковою умовою є вивчення морфологічного (за необхідності гістохімічного) стану органів і тканин.

- Забарвлення гістологічних зрізів гематоксиліном та еозином.
- Забарвлення гістологічних зрізів за ван Гізоном.
- Забарвлення гістологічних зрізів за Ніслем.
- Виявлення ліпідів суданом чорним.

## 6. Мікрофотографування гістологічних препаратів

Мікрофотографування забарвлених гістологічних препаратів є відповідальною і важливою частиною морфологічного дослідження.

- Процес мікрофотографування умовно можна поділити на такі етапи:
  - а) підготовка гістологічних препаратів до фотографування;
  - б) мікрофотографування гістологічних препаратів.
- Виготовлення фотонегативів і мікрофото здійснюється за загальними правилами мікрофотографування [10].
- Фрагмент Звіту про патоморфологічні дослідження ЛЗ потрібно написати чітко та ілюструвати мікрофото знімками.
- Висновок Звіту про патоморфологічні дослідження ЛЗ повинен бути обґрунтованим.

### Карта експерименту

Тема № \_\_\_\_\_ Код \_\_\_\_\_  
 Технічне завдання \_\_\_\_\_

Керівник дослідження (посада, П.І.Б.) \_\_\_\_\_

Виконавець (посада, П.І.Б.) \_\_\_\_\_

Термін виконання: Початок \_\_\_\_\_ Закінчення \_\_\_\_\_

Початок експер.	Вид тварини, стать	Група, (кількість тварин)	Доза ЛЗ, мг/кг	Шлях введення ЛЗ	Частота введення ЛЗ	Термін евтаназії	Дата отримання тварин	№ тварини	Дата евтаназії	Морфологія макро-мікро-	Зауваження

Відділ \_\_\_\_\_ Відділ патоморфології \_\_\_\_\_  
 Ст. лаборант \_\_\_\_\_ Дата \_\_\_\_\_

## Звіт про патоморфологічне дослідження

Тема №	Тварина №	Стать	Дата/час розтину				
Група	Гризун Мітка на тварині	Мертвий	1 год	1-5 год	5 год		
Вид		Умертв. у тяжкому стані	Проміжне умертвіння	Заключне умертвіння			
Доза/шлях введення ЛЗ		ефір		тіопентал Na			
Період дослід (сезон)		Маса тіла		Токсикологічна лаб.			
Лаборант з розтину тварин /підпис _____ / Дата _____							
Історія/детальна назва технічного завдання							
Керівник технічного завдання/підпис _____ Дата _____							
Загальні висновки (зовнішні)							
Загальні висновки (внутрішні)							
Прозектор _____ Дата _____							
<b>М а с а о р г а н і в</b>							
Орган	Маса	Орган	Маса	Орган	Маса	Орган	Маса
Надниркова л. залоза п.		Гіпофіз		Нирка л. п.		Простата/ матка	
Яечник л. п.		Мозок		Селезінка		Яечко л. п.	
Щитоподібна залоза		Серце		Печінка			
		Легені		Підшлункова залоза			
Зважив _____ Дата _____			Зважив _____ Дата _____				
Відп. наук. співробітник _____						Дата _____	

Гістологія

Надійшло на аутопсію	Тканина (інші вказати)	№ показника		Спеціальні (детальні визначення)	№ показника
		*	**		
	Печінка				
	Жовчний міхур				
	Нирки				
	Серце				
	Легені				
	Селезінка				
	Тимус				
	Язик				
	Слинна залоза				
	Трахея				
	Щитоподібна залоза				
	Стравохід				
	Шлунок				
	Дванадцятипала кишка				
	Тонка кишка				
	Товста кишка				
	Лімфатичний вузол брижів				
	Підшлункова залоза				
	Надниркові залози				
	Гіпофіз				
	Яєчники				
	Матка				
	Простата				
	Яєчко				
	Сечовий міхур				
	Шкіра				
	Молочні залози				
	Аорта				
	Мозок				
	Спинний мозок				

\* гематоксилін-еозин

\*\* судан чорний

Науковий співробітник \_\_\_\_\_ Дата \_\_\_\_\_

Тільки для використання у відділі

Примітка

Пояснити примітку

Лаборант		Дата	
Лаборант		Дата	

## Лист інструкції розтину

Тема № \_\_\_\_\_ Тварина \_\_\_\_\_

Вид \_\_\_\_\_

## Органи, що досліджуються

Органи (тканини), що потрібно взяти	Органи, що потрібно зважувати	
Печінка	Надниркова залоза	ліва
Жовчний міхур		права
Нирки	Яечник	лівий
Серце		правий
Легені	Щитоподібна	ліва доля
Селезінка	залоза	права доля
Тимус	Гіпофіз	
Язик	Мозок	
Слинні залози	Серце	
Трахея	Печінка	
Щитоподібна залоза	Легені	
Стравохід	Нирки	
Шлунок	Селезінка	
Дванадцятипала кишка	Простата/Матка	
Тонка кишка	Тимус	
Клубова кишка	Підшлункова залоза	
Сліпа кишка	Яечко	ліве
Ободова кишка		праве
Лімфатичний вузол брижів		
Підшлункова залоза		
Надниркові залози		
Гіпофіз		
Яечко/Яечник		
Простата/Матка		
Сечовий міхур		
Шкіра		
Мозок		
Очі		
Кістка		
Аорта		
Скелетні м'язи		

Відповідальний лаб. \_\_\_\_\_

Дата \_\_\_\_\_

Перевірено наук. співробітником \_\_\_\_\_

Дата \_\_\_\_\_

**Література**

1. Методичні рекомендації по представленню документації на лікарські засоби у Фармакологічний комітет Міністерства охорони здоров'я України.– Київ, 1993.– 39 с.
2. Эвтаназия экспериментальных животных/Методические рекомендации по выведению животных из эксперимента.– Москва, 1985.– 13 с.
3. Белоярцев Ф.Ф. О действии эфира, тиопентала и аминазина на мозг и печень//Эксперим. хирургия и анестезиол.– 1965.– №1–3.– С. 86–90.
4. Гацура В.В., Саратиков А.С. Фармакологические агенты в экспериментальной медицине и биологии.– Томск, 1977.– 154 с.
5. Standard Operating Procedures in Pathology. Including Developmental Toxicology and Quality Assurance.– Lancaster, England: International Medical Publishers, 1979.– P. 210.
6. Западнюк И.П., Западнюк В.И., Захария Е.А. Лабораторные животные. Разведение, содержание, использование в эксперименте.– Киев: Вища шк., 1974.– 303 с.
7. Ромейс Б. Микроскопическая техника.– Москва: Иностран. лит., 1953.– 718 с.
8. Меркулов Г.А. Курс патологистологической техники.– Ленинград: Медицина, 1969.– 422 с.
9. Волкова О.З., Елецкий С.К. Основы гистологии с гистологической техникой.– Москва: Медицина, 1971.– С. 167–168.
10. Апфельт Г. Введение в методы микроскопического исследования.– Москва: Медгиз, 1959.– С. 319–368.



## Розділ III

# ОЦІНКА СПЕЦИФІЧНОЇ ФАРМАКОЛОГІЧНОЇ АКТИВНОСТІ ЛІКАРСЬКИХ ЗАСОБІВ

## ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНЕ ВИВЧЕННЯ АНТИАРИТМІЧНИХ ТА АНТИФІБРИЛЯТОРНИХ ЛІКАРСЬКИХ ЗАСОБІВ

Горчакова Н.О.,  
Чекман І.С.,  
Зупанець І.А.,  
Соловйов А.І.,  
Столярчук О.О.,  
Мохорт М.А.,  
Французова С.Б.,  
Данільчук М.А.,  
Степанюк Г.І.,  
Ніженковська І.В.,  
Серединська Н.М.

### Перелік скорочень

**АлАТ** – аланінамінотрансфераза  
**АсАТ** – аспаргатамінотрансфераза  
**КФК** – креатинфосфокіназа  
**ЛДГ** – лактатдегідрогеназа  
**МДГ** – малатдегідрогеназа  
**ПОЛ** – перекисне окислення ліпідів  
**СДГ** – сукцинатдегідрогеназа  
**СОД** – супероксиддисмутаза  
**ЦНС** – центральна нервова система

### Вступ

Останнє десятиріччя характеризується широким впровадженням у практику терапії аритмій немедикаментозних засобів лікування, включаючи різні типи імплантованих електростимулюючих приладів. Однак донині фармакотерапія залишається методом вибору для лікування більшості порушень ритму серця. На сучасному етапі створена значна кількість нових лікарських засобів з антиаритмічною дією. Але застосування їх у клініці можливе лише після всебічних лікарських випробувань та отримання максимально повної інформації про ефективність та особливості дії з метою розробки рекомендацій із застосування у практиці охорони здоров'я.

Дані методичні рекомендації уніфікують методичні підходи до експериментальних (доклінічних) досліджень для отримання об'єктивно співставимих результатів досліджень, що проводяться у різних науково-дослідних лабораторіях і медичних центрах.

Дана розробка заснована на стандартах міжнародної системи GLP, методичних рекомендаціях з доклінічного вивчення нових лікарських засобів, а також Panlabs General Pharmacology Service Program, General Screening Program.

## 1. Загальні положення

До протиаритмічних засобів відносяться речовини, здатні запобігти чи купірувати порушення серцевого ритму (аритмію). Експериментальні (доклінічні) дослідження проводять з метою виявлення специфічної активності, її кількісної оцінки і безпечності використання порівняно з препаратами аналогічної дії (хінідином, новокаїнамідом, кордароном, лідокаїном та ін.).

Антиаритмічні препарати, які застосовують у медицині, розрізняють за фармакологічними властивостями, механізмами дії на електрофізіологічні процеси у мембрані міокардіальних клітин, а також ефективністю при браді- та тахіаритміях і фібриляції.

Для лікування брадіаритмії застосовують:

I. М-холіноблокатори (атропіну сульфат, настойку красавки, краплі Зеленіна, іпратропію бромід).

II. Адреноміметики (адреналіну гідрохлорид, норадреналіну гідротартрат, ізадрин, окситропію бромід).

III. Глюкагон.

Для лікування тахіаритмії застосовують:

I. Мембраностабілізатори (блокатори натрієвих каналів):

а) хінідину сульфат, новокаїнамід, дизопірамід, аймалін, неогілуритмал, етмозин (також відносять до групи «в»), повільно зменшують тік натрію і кальцію під час деполяризації, калію – при реполяризації. Посідають проміжне місце за швидкістю зв'язування з натрієвими каналами.

б) лідокаїн, тримекаїн, дифенін, мексилетин, токаїнід. Слабко впливають на вхід іонів натрію в клітини, підвищують проникність мембран для калію. Швидко зв'язуються з каналами і швидко їх вивільнюють.

в) прошафенон, флекаїнід, етацизин (іноді відносять до групи «а»). Найбільшою мірою пригнічують натрієвий тік. Препарати повільно зв'язуються з натрієвими каналами, повільно їх вивільнюють.

II. Бета-адреноблокатори – анаприлін, талінолол, надолол, окспренолол, атенолол, метопролол та ін.

III. Засоби, що уповільнюють реполяризацію та подовжують потенціал дії – аміодарон, соталол, ібутилід, бретилій, азитилід.

IV. Антагоністи кальцію – верапаміл, галопаміл, дилтіазем, фендилін.

Антиаритмічну дію мають також:

1. Серцеві глікозиди наперстянки – дигітоксин, дигоксин, целанід, лантозид.

2. Метаболітні препарати – аденозин, неогон, рибоксин.

3. Препарати калію та магнію – аспаркам, панангін, калію хлорид, камнор та ін.

4. Препарати лікарських рослин – рідкий екстракт та настойка глоду колючого та інші.

Програма проведення пошуку антиаритмічних засобів вклучас:

I етап. Визначення антиаритмічної дії досліджуваних сполук.

II етап. Вивчення характеру і спектру дії відібраних сполук.

III етап. Вивчення механізмів дії найбільш активних сполук, електрофізіологічні дослідження.

Пошук нових антиаритмічних засобів розпочинають з вивчення хімічних сполук з приблизним механізмом дії на певних моделях, аналогічних до клінічних ситуацій. Деякі моделі нагадують аритмії передсердя, шлуночків або є змішаними. Скринінг антиаритмічних сполук можна провести на підставі тестів, що характеризують головні властивості міокарда (зміни автоматизму, збудливості, провідності). Застосування дослідів на кількох моделях дозволяє вибрати найбільш ефективну сполуку.

## 2. Загальні вимоги до протиаритмічних засобів

Нові речовини, запропоновані як антиаритміки, повинні переважати відомі сучасні протиаритмічні препарати за активністю або широтою протиаритмічної дії (протиаритмічний індекс

DL<sub>50</sub>/DE<sub>50</sub>) чи мати інші переваги перед ними – більш виражену безпечність (особливо при тривалому використанні), відсутність побічних ефектів і т.п. Згідно з Panlabs General Pharmacology Service Program, General Screening Program антиаритмічні препарати вивчають за такою схемою. Інтраперитонеально вводять речовину, яка вивчається, (мг/кг) трьом щурам, за 30 хв до цього наркотизованим хлороформом чи іншим препаратом. Упродовж 15 хв записують ЕКГ. Препарат вважається ефективним, якщо частота серцевих скорочень понад 200 уд./хв, спостерігається не більше ніж у однієї з трьох тварин.

Препарати для порівняння (мг/кг):

Дилтіазем	50
Лідокаїн	50
Мексилетин	50
Піндолол	50
Прокаїнамід	100
Пропранолол	40
Верапаміл	50
Флекаїнід	10
Хінідін	100

### 3. Методи виявлення протиаритмічної активності

#### 3.1. Вплив досліджуваних речовин на величину рефрактерного періоду

Дослідження проводять за методом Doves в модифікації Alles та Ellis (1948) на ізольованому вушку передсердь. Для цього вушко правого передсердя кроля або мурчака вміщують до спеціальної двостінної ванночки (бані), яка перфузується оксигенованим розчином Рингер-Локка при температурі 29–31°C (остання підтримується за допомогою ультратермостату). Через 15–20 хв вушко подразнюють струмом за допомогою електростимулятора, підвищуючи частоту до моменту, коли вушко припиняє засвоювати відповідний ритм. Цю частоту розцінюють як максимальну величину, що відповідає рефрактерному періоду. Після цього у ванночку додають досліджувану речовину і повторюють дослід. За наявності у препарату протиаритмічного ефекту максимально вироблена вушком серця частота скорочень зменшиться. Кожну концентрацію досліджуваної речовини випробовують на 4–5 препаратах вушка.

Зміни рефрактерного періоду обчислюють у відсотках. Активність досліджуваних речовин та стандартних препаратів порівнюють за ЕС (у моль/л) – концентрацією речовин, яка зменшує максимально вироблену частоту скорочень ізольованого вушка на 15%.

#### 3.2. Аконітинова аритмія

Механізм впливу аконітину на міокард складний і призводить до порушення майже всіх функцій серця. Його вплив обумовлений як безпосередньою дією на міокард, так і опосередковується центральною нервовою системою. Аконітин пригнічує функцію синусового вузла та підвищує збудливість міокарда, що призводить до появи численних пейсмейкерів (ектопічних вогнищ збудження). Є дані, згідно з якими аконітин викликає десинхронізацію процесів поляризації і деполяризації, порушує функцію натрієвих каналів, перешкоджаючи їх інактивації. Для скринінгу можна рекомендувати досліді на щурах, які перебувають у вільній поведінці (без використання наркозу). Тваринам вводять у черевну порожнину засіб, що вивчається, у потенційно антиаритмічній дозі. Через 0,5 години внутрішньовенно вводять аконітин у дозі 100 мкг/кг. Якщо препарат має протиаритмічну дію, загибель щурів зменшується. У контрольних дослідках (без введення антиаритміка) протягом 20 хв гине приблизно 97,7% щурів (B.Guttere et al., 1987). У наркотизованих білих щурів (етамінал-натрій у дозі 30 мг/кг у черевну порожнину) аконіти-

нову аритмію моделюють шляхом його внутрішньовенного введення у дозі 30–40 мкг/кг. Досліди проводять на групі з 7–10 тварин обох статей масою 120–200 г; контролем є група щурів, яким вводять фізіологічний розчин. Порушення серцевого ритму під дією аконітину розвиваються зазвичай через 2–3 хв і мають різноманітний характер – поодинокі та групові екстрасистоли, шлуночковий ритм та ін. Аритмія триває понад 1 годину і закінчується поновленням ритму. Частина тварин при цьому гине. Досліджувану речовину вводять внутрішньовенно за 5–10 хв до введення аконітину (профілактична дія) або на фоні розвиненої аритмії (лікувальна дія). Враховується кількість тварин, в яких аритмія не виникла чи була купірована, а також кількість загиблих щурів у кожній серії. Можна досліджувану речовину ввести профілактично за 1–2 хв до введення аконітину. Тривалість аритмії становить у середньому 1,5–2 години. Активність сполук оцінюють за їх здібністю попереджати розвиток порушень ритму під впливом аконітину. Критерієм активності є  $DE_{50}$  (за методом Літчфілда та Уїлкоксона), про широту терапевтичної дії свідчить відношення  $DL_{50}/DE_{50}$  (антиаритмічний індекс).

Згідно з General Screening Program вивчення антиаритмічних сполук на моделі аконітинової аритмії і шлуночкової тахікардії відбувається таким чином. Досліджувану субстанцію вводять 3 мишам за 15 хв до введення аконітину (1,25 мкг/мл/хв). Визначають час (в секундах) до початку розвитку аритмії. За порушення ритму приймають будь-яке відхилення від нормального синусового ритму, яке утримується протягом 5 секунд і більше. Зростання часу від моменту введення аконітину до початку розвитку аритмії більше ніж на 50% свідчить про ефективність препарату. Пропонується порівнювати ефекти досліджуваних речовин з такими препаратами (концентрації в мг/кг):

НАЗВА	АРИТМІЯ	ТАХІКАРДІЯ
Верапаміл	10	10
Дізонірамід	>100	>100
Дилтіазем	10	10
Лідокаїн	100	100
Мексилетин	50	50
Ніфедипін	>100	>100
Пропранолол	50	50
Хінідин	50	50
Флекаїнід	10	10
Тимолол	100	100

### 3.3. Хлоридкальцієва аритмія

Токсичні дози кальцію хлориду сприяють звільненню більшої кількості катехоламінів з нервових закінчень, збільшують чутливість до них адренорецепторів міокарда. Під впливом кальцію хлориду підвищується проведення натрію плазматичною мембраною, порушується іонний гомеостаз. Цей вид аритмії недостатньо вивчений, тяжко перебігає і важко піддається дії протиаритмічних речовин. Хлорид кальцію у вигляді 10% ампульного розчину в дозі 220–250 мг/кг вводять внутрішньовенно наркотизованим щурам. Залежно від швидкості введення отримують різний ефект: при швидкому введенні кальцію хлориду в першу хвилину на фоні брадикардії з'являються екстрасистоли, які закінчуються фібриляцією шлуночка; повільне введення може викликати лише короткотермінову брадикардію без будь-яких інших порушень ритму. При використанні хлоридкальцієвої аритмії необхідно підібрати аритмогенну дозу хлориду кальцію і вводити її завжди з постійною швидкістю. Досліджувані сполуки вводять внутрішньовенно за 2–5 хв до введення аритмогена. Результати треба порівнювати з ефектом новокаїнамід (20 мг/кг), який при цій аритмії достатньо ефективний (M.R.Malinov et al., 1953). Еталонним засобом може бути антагоніст кальцію. Модель застосовують для пошуку антиаритміків I та IV класів (див. розд. 1).

### **3.4. Хлоридбарієва аритмія**

Хлорид барію в діастолічній фазі серцевого ритму знижує проникність клітинних мембран для калію та підвищує її для натрію. Цим пояснюють його аритмогенну дію. Досліди проводять на кролях масою 2,5–3,5 кг без використання наркозу. Тваринам внутрішньовенно вводять хлорид барію в дозі 4 мг/кг у вигляді 1% розчину. Аритмія продовжується від 15 до 25 хв. Встановлюють тривалість аритмії у кожного з піддослідних кролів, тварин використовують через кожні 3–4 дні ще 3–4 рази. У наступних дослідах вивчають як попереджуючу, так і купіруючу дію досліджуваних сполук при внутрішньовенному чи внутрішньоочеревинному введенні за 5–10 хв до введення хлориду барію чи одразу ж після виникнення аритмії. Порівнювати ефекти досліджуваних речовин рекомендується з кордароном у дозі 5 мг/кг (М.В. Львов, 1973). Модель застосовують для пошуку антиаритміків III класу.

### **3.5. Строфантинова аритмія**

Ця модель порушення ритму серця починається з брадикардії, на фоні якої виникають екстрасистоли, і яка може закінчуватися фібриляцією шлуночків. Її підґрунтям є гальмування натрій-калієвої-АТФ-ази, що сприяє підвищенню внутріклітинної концентрації кальцію, порушенню електролітного балансу, аритмогенна дія строфантину реалізується також через серотонін- та гістамінергічні структури мозку. Строфантинову модель аритмії викликають у мурчаків чи котів, наркотизованих нембуталом (30 мг/кг, внутрішньоочеревинно). Ампульний строфантин-К вводять внутрішньовенно в дозах 0,25 та 0,09–0,12 мг/кг відповідно в 0,01% концентрації. Котам попередньо вводять 0,07 мг/кг строфантину, потім через кожні 10 хв вводять ще по 0,01 мг/кг до появи аритмії. Досліджувані речовини вводять внутрішньовенно зразу ж після виникнення аритмії. Порівнювати рекомендують з кордароном у дозі 5 мг/кг (Е.И. Аммар, А.Н. Кудрин, 1969). Аритмію можна викликати у мурчаків, наркотизованих ефіром, внутрішньовенним введенням строфантину-Г у дозі 250 мкг/кг, що адекватно строфантину-К у дозі 500 мкг/кг. Досліджувану сполуку вводять за 2–3 хв до строфантину.

### **3.6. Адреналінова аритмія**

Аритмогенний ефект адреналіну обумовлений підвищенням провідності плазматичної мембрани для іонів кальцію, що призводить до виникнення ектопічної пейсмеркерної активності як у передсердях, так і в шлуночках. Адреналіну гідрохлорид вводять внутрішньовенно і швидко кролям у дозі 120–150 мкг/кг у вигляді 0,1% розчину. Виникає брадикардія з політопною екстрасистолією, яка поступається місцем шлуночкової тахікардії. Аритмія продовжується 5–7 хв, через 30 хв кролям вводять (внутрішньом'язово, внутрішньоочеревинно чи внутрішньовенно) досліджувану речовину і знову внутрішньовенно вводять таку саму аритмогенну дозу адреналіну. Протиаритмічну активність досліджуваної сполуки оцінюють за попередженням як виникнення аритмії, так і загибелі тварин, якщо введення адреналіну призводить до летальності. Адреналінову модель аритмії можна відтворити в дослідах на котах та собаках при швидкому введенні до вени адреналіну в дозі 100 мкг/кг, а також на щурах. Щоб здійснити більш стійкий та тривалий ефект, адреналін можна ввести разом з інгаляційними засобами (ефір, фторотан, ізофлуран). Ефірно-адреналінову модель відтворюють на кіпках масою 3 кг. Тварин наркотизують внутрішньовенним введенням 30 мг/кг етаміналу натрію. Катетеризують яремну вену для введення досліджуваної сполуки та сонну артерію для реєстрації артеріального тиску. ЕКГ реєструють у II стандартному відведенні. Досліджувану сполуку вводять в 3 мл дистильованої води. Після повторного запису ЕКГ адреналін вводять внутрішньовенно в дозі 20 мкг/кг одночасно з ефіром, який інстилюють у трахею з розрахунку 0,1 мл/кг через катетер, який вводять за допомогою ларингоскопа. Записи ЕКГ відтворюють через 1, 3, 5, 10, 15, 30 та 50 хв. Адреналінову модель застосовують для пошуку антиаритміків II та IV класу.

### **3.7. Післяінфарктна аритмія**

Цей вид аритмії характеризується пароксизмальною тахікардією та шлуночковими екstrasистолами. За генезом та клінічними проявами вона подібна до аритмії, яка супроводжує тяжкий перебіг ішемічної хвороби у людей (О.О Столярчук та ін., 1990). Експеримент проводять на котах чи собаках під наркозом. У котів при штучному диханні розтинають грудну клітку, перев'язують низхідну гілку лівої коронарної артерії на межі верхньої і середньої третини. Аритмія виникає у більшості тварин приблизно через 30 хв після коронарооклюзії, продовжується протягом двох чи більше годин і закінчується фібриляцією чи асистолією. Досліджувані антиаритміки вводять внутрішньовенно відразу після виникнення аритмії. У собак в асептичних умовах, також під наркозом, при розтині грудної клітки перев'язують низхідну гілку лівої коронарної артерії на межі нижньої та середньої третини. Грудну клітку ушивають пошарово, створюють від'ємний тиск у плевральній порожнині шляхом відкачування з неї повітря за допомогою відсмоктувача. Аритмія виникає наступного дня. Досліджувані сполуки можна вводити різними шляхами: внутрішньовенно, внутрішньом'язово, підшкірно, внутрішньошлуночково протягом кількох днів. Післяінфарктну аритмію можна відтворити і на білих щурах шляхом високого перев'язування лівої коронарної артерії. Аритмію, яка виникла, купірують внутрішньовенним введенням досліджуваних речовин.

### **3.8. Дослідження впливу сполук на поріг фібриляції шлуночків на фоні ізадринного ураження міокарда**

При ізадринному ураженні міокарда, як і при інфаркті міокарда, підвищується можливість розвитку фатальних аритмій, в тому числі й фібриляції шлуночків. При цьому може змінюватись реакція міокарда на дію лікарських засобів. Введення тваринам великих доз ізадрину викликає значні порушення функції міокарда, які супроводжуються збільшенням поглинання кисню, зменшенням запасів АТФ і креатинфосфату, виникненням вогнищ некрозу в результаті гострої коронарної недостатності. Попереднє введення тваринам ізадрину дозволяє виявити вплив сполуки на електричну стабільність ураженого міокарда, тобто за умов патології.

Дослідження проводять на наркотизованих етаміналом натрію (40 мг/кг) білих щурах за умов штучного апаратного дихання при розкритій грудній клітці і вільному доступі до серця. Спочатку визначають поріг фібриляції, потім внутрішньом'язово вводять ізадрин (60 мг/кг). Через 15 хв знову визначають поріг фібриляції (який під впливом ізадрину зменшується), вводять внутрішньовенно досліджувану сполуку і втретє вимірюють поріг фібриляції. При його збільшенні вимірювання проводять кожні 10–15 хв до моменту повернення порогу до початкового рівня (до введення досліджуваної сполуки). Отримані результати порівнюють з початковим рівнем порогу, а також з дією відомих препаратів, наприклад, лідокаїну, кордарону.

### **3.9. Центрогенні порушення серцевого ритму**

Порушення реалізуються через симпатичну систему дією на альфа- і бета-адренорецептори міокарда. Для моделювання аритмії найчастіше як аритмогенний агент використовують аконітин, який в дозі 2 мкг/кг у 0,01% розчині вводять наркотизованим котам до мозково-мозочкової цистерни (порожнища 4-го шлуночка), потім через кожні 5–7 хв повторно вводять таку ж дозу аконітину до виникнення аритмії. Центральні порушення серцевого ритму викликають за допомогою введення в порожнину 4-го шлуночка головного мозку строфантину в дозі 0,01–0,04 мг/кг у 0,02% розчині чи барію хлориду в дозі 1–2 мг/кг у 1% розчині (В.Н. Павлов, 1976).

### **3.10. Вплив досліджуваних речовин на передсердні порушення ритму**

Досліджувані речовини за цієї патології випробовують за методом A.Rosenblueth, G.Ramos (1949). У наркотизованих (гексенал 40 мг/кг внутрішньоочеревинно + дроперидол 0,3 мг/кг

внутрішньом'язово) собак при штучній вентиляції легенів оголюють серце і за допомогою за- тиску руйнують синусовий вузол, розміщений на ділянці між устями v.cava sup. et inf. Після цього передсердя подразнюють за допомогою електростимулятора прямокутними імпульсами постійного струму тривалістю 1 мс, амплітудою 10–20 В і частотою 1,5–2,0 Гц. Зміни елек- тричної активності передсердь реєструють на електрограмі правого передсердя, шлуночків – записом ЕКГ у другому стандартному відведенні. Досліджувані речовини вводять у вену на фоні аритмії і оцінюють їхню дію.

### ***3.11. Модель шлуночкових аритмій, викликаних двосхідним перев'язуванням коронарної артерії***

Шлуночкові порушення ритму викликають оклюзією низхідної гілки лівої коронарної арте- рії у собак за методом Haggis, при цьому характер порушень ритму нагадує пароксизмальну та- хікардію і шлуночкову екстрасистолію. Перев'язування здійснюють у 2 етапи. Подвійну ліга- туру підводять під артерію у верхівки лівого вушка. Інтервал між частковою та повною оклю- зією становить 24 години. Порушення ритму виражаються в шлуночковій тахікардії і екстра- систолії. Аритмія триває 2–3 доби, дослідження дії сполук проводять через 24 години після повної оклюзії коронарної артерії. ЕКГ реєструють у II стандартному відведенні. Ефек- тивність сполук визначають на підставі здатності поновлювати синусовий ритм. Розрахову- ють процент ектопічних і нормальних скорочень.

### ***3.12. Шлуночкові аритмії, викликані гострою оклюзією коронарної артерії та їх різкою реперфузією***

Гостра оклюзія низхідної гілки лівої коронарної артерії у наркотизованих етаміналом нат- рію (35 мг/кг) котів або кролів веде до розвитку різних порушень ритму шлуночків, які після різкої реперфузії мають більш виражений характер (до фібриляцій шлуночків). Антифібри- латорну активність сполук також можна вивчати на цій моделі.

### ***3.13. Модель гострої оклюзії коронарної артерії в хронічному експерименті***

Дослідження проводять у 2 етапи на білих щурах-самцях масою 180–200 г. На першому етапі розтинають грудну клітку під ефірним наркозом в 4 міжребер'ї праворуч. Потім у вер- хній третині лівої низхідної коронарної артерії вживлюють оклюдер. Нитку оклюдера прово- дять під артерією атравматичною голкою, кінці нитки виводять на грудині в ділянці 4 міжре- бер'я. Потім грудну клітку зашивають, кінці нитки виводять під шкіру. Через 4–5 днів кінці лігатури вивільнюють, стягують над артерією, через 1–1,5 години записують ЕКГ. Речовини вводять внутрішньовенно за 3–5 хв або всередину за 30 хв до оклюзії.

### ***3.14. Модель вивчення впливу речовин на порушення ритму передсердь***

Порушення ритму передсердь у собак викликають під морфіно-уретановим наркозом при штучному диханні. Серце відкривають та руйнують синусовий вузол на ділянці між устями верхньої та нижньої порожнистих вен. Потім передсердя подразнюють прямокутними стиму- лами тривалістю 1 мс, напругою, що вдвічі перевищує порогову, при частоті імпульсів 15– 20 Гц. Реєструють електричну активність передсердь. Досліджувані сполуки вводять через 30 хв після виникнення порушення ритму. Порушення ритму після механічного руйнування синусового вузла та подразнення електричним струмом характеризуються миготінням перед- сердь, при цьому частота скорочень передсердь збільшується в 2–7 разів порівняно з вихід-



ною. Частота скорочень також зростає (від кількох ударів до 2–3 разів). Антиаритмічна активність сполук оцінюється за методом біологічного титрування при внутрішньовенному введенні (1 мг/кг в 1 мл в 1 хв) до повної нормалізації синусового ритму. Виникнення ектопічної пейсмейкерної активності у передсердях можна здійснити місцевою аплікацією аконітину, вератрину, барію хлориду, що змінюють провідність іонних каналів мембран кардіоміоцитів.

### ***3.15 Модель фібриляції передсердь у дослідях на наркотизованих котах***

Досліди проводять на котах, анестезованих уретаном та хлоралозою в дозах 75 та 15 мг/кг відповідно (внутрішньоочеревинно). Проводять штучну вентиляцію легенів. Через яремну, стегнову вени вводять у праве передсердя біполярні електроди для реєстрації передсердної електрокардіограми та стимуляції передсердь. У шийному відділі препарують і виділяють блукаючий нерв, який перерізають на периферичному його кінці. Накладають платинові електроди з відстанню між ними 2 мм. Реєструють ЕКГ та електрограму. За допомогою електростимулятора знаходять поріг подразнення блукаючого нерва (2 мс, 30 імпульсів/хв), іноді частоту змінюють. Після початку стимуляції нерва на фоні зменшення частоти скорочень в 2 та більше разів проводять парну стимуляцію передсердя (5 мс), яка веде до фібриляції. Речовину вводять внутрішньовенно.

### ***3.16 Модель аритмії та фібриляції шлуночків за допомогою біполярних електродів***

Досліди проводять на наркотизованих нембуталом (40 мг/кг) котах масою 2–4 кг при штучному диханні. Температуру тіла підтримують на рівні 37°C за допомогою зовнішнього підігріву. Артеріальний тиск реєструють у стегновій артерії електроманометром. Порушення серцевого ритму, які реєструють за допомогою ЕКГ у II відведенні, викликають за допомогою підшитих до міокарда правого шлуночка біполярних електродів. Електричним подразненням створюють штучне «ектопічне вогнище» для отримання окремих або групових екстрасистол. Для створення фібриляції застосовують різні параметри подразнюючих стимулів. Доки ритм не засвоюється, серце не реагує на імпульси з «ектопічного вогнища». Чим менше частота нав'язаних з «ектопічного вогнища» стимулів подразнення засвоюється серцем, тим більшу антиаритмічну дію має досліджувана сполука. Поріг фібриляції визначають повторним скануванням надчутливого періоду (висхідна частина зубця Т) серією прямокутних імпульсів тривалістю 1–4 мс (застосовують 20–90 імпульсів). За значення порога приймають мінімальну інтенсивність струму в мілівольтах, що викликає фібриляцію шлуночків. Дефібриляцію можна викликати дефібрилюючим розрядом певної інтенсивності, що подається від апарату ДІ-03. Досліджувані сполуки вводять внутрішньовенно, визначаючи мінімальну частоту скорочень, коли серце перестає засвоювати нав'язаний ритм. Ця частота відображає зміни реактивності рефрактерного періоду під впливом речовин, а також мінімальну силу струму, необхідну, щоб викликати фібриляцію шлуночків.

### ***3.17 Реперфузійні аритмії і фібриляції серця***

Дані порушення серцевого ритму обумовлені багатьма факторами, що підтверджується їх попередженням (правда, не в усіх випадках) протиаритмічними препаратами з різноманітними механізмами дії: антиоксидантами, антитромбоксантами та ін. У результаті оклюзії коронарної артерії в осередку аритмії утворюються вільні кисневі радикали, які призводять до росту кальцієвої проникності сарколеми і переважанню кальцієм (кальцієвий парадокс), тромбоксаном-А<sub>2</sub> та ін., порушується електролітний баланс. Вимивання цих та інших продуктів з осередку ішемії під час реперфузії викликає тяжкі порушення ритму (В.Г.Стожук, 1985).

### Досліди на щурах

Високе перев'язування у наркотизованих щурів лівої коронарної артерії призводить до тахікардії, яка закінчується аритмією і фібриляцією. Досліджувані сполуки вводять до перев'язування або після нього внутрішньовенно з метою попередження або купірування аритмії.

### Досліди на котках

У наркотизованих тварин відкривають грудну клітку і при штучному диханні оголюють серце. Низхідну гілку лівої коронарної артерії лігують у верхній її третині. Через 25–30 хв лігатуру швидко розпускають. Фібриляція виникає у 80% випадків. Сполуки, що випробовуються, вводять за 10–20 хв до реперфузії внутрішньовенно.

### Досліди на собаках

Фібриляція шлуночків серця у наркотизованих (гексенал 40 мг/кг внутрішньоочеревинно + дроперидол 0,3 мг/кг внутрішньом'язово) собак моделюється шляхом високого перев'язування міжшлуночкової гілки лівої коронарної артерії. До і після лігування коронарної судини знімається епікардіальна електрограма за допомогою електрокардіографа з однополюсним срібним електродом. Фібриляція шлуночків серця виникає в 100% випадків через 5–20 хв після коронарооклюзії. Визначення протифібриляторного ефекту здійснюється за відсутністю розвитку фібриляції шлуночків серця, її запізненням і попередженням загибелі експериментальних тварин. Також визначають вплив досліджуваних речовин на вираженість ішемії міокарда, що здійснюється на епікардіальній електрограмі.

### **3.18. Вплив на поріг фібриляції шлуночків**

Фібриляцію шлуночків викликають шляхом нанесення прямокутного електричного імпульсу на міокард в уразливий період електричної активності серця (висхідна частина зубця Т на ЕКГ) за допомогою електростимулятора. Визначають мінімальну силу струму (в мА), яка викликає фібриляцію. Платинові електроди вводять: один в верхівку серця, другий – підшкірно в ділянці нижньої частини тулуба тварини. Після визначення порогу фібриляції вводять досліджувані сполуки і знову визначають поріг фібриляції через різні проміжки часу доти, поки він не відновиться до початкового рівня (В.Н. Титов, В.М. Шаргородский, 1977). Досліди проводять на наркотизованих котках та щурах. У останніх фібриляція, яка виникла, проходить самостійно протягом першої хвилини. У котів фібриляцію треба зняти дефібрилятором ІД-66 при напрузі від 2,5 до 3,5 кВ. Про наявність аритмії при відтворенні і про характер дії досліджуваних речовин в усіх дослідженнях судять за показниками ЕКГ, яка знімається у II стандартному відведенні. Кінцевим етапом вивчення протиаритмічної активності досліджуваних сполук є досліди на аконітиновій, післяінфарктній та реперфузійній аритміях не менше ніж на двох видах тварин. Ступінь нешкідливості протиаритмічних речовин досліджується загальноприйнятими методичними прийомами.

### **3.19. Електрофізіологічні дослідження**

Відомо, що більшій частині антиаритмічних препаратів притаманна здатність до місцевої анестезії, обумовлена блокуванням під їхнім впливом натрієвих каналів плазматичної мембрани. Цей механізм дії є основним для найчастіше вживаних антиаритмічних засобів-мембранодепресантів: хінідину, новокаїнамідну та ін. Блокада натрієвих каналів сприяє підвищенню рефрактерності та пригніченню аномальної пейсмекерної активності в міокарді. При оцінці ефективності потенційної антиаритмічної сполуки вивчається її вплив на вхідний натрієвий струм. З цією метою найчастіше використовують метод реєстрації іонних струмів в ізольованих кардіоміоцитах (метод patch-clamp) чи в смужках міокарда (цукровий місток) за умов фіксації мембранного потенціалу. Як досліджуваний параметр найчастіше використовують

ють амплітуду вхідного натрієвого струму чи швидкість зростання  $dp/dt_{\max}$  чи  $V_{\max}$  потенціалу дії, яка є відображенням величини вхідного натрієвого струму, що визначає формування фази швидкого зростання (фаза 0) нормального потенціалу дії в клітинах передсердя, передсердно-шлуночкового пучка волокон Пуркінє і міокарда шлуночків. Для успішного використання  $V_{\max}$  як критерію натрієвої провідності, необхідно виконувати ряд умов: а) іонний струм вздовж волокон повинен дорівнювати 0; б) мембранний потенціал, при якому досягається  $V_{\max}$ , повинен мати постійну величину, що не залежить від зовнішніх впливів; в) затримка між стимулом і моментом досягнення  $V_{\max}$  повинна бути постійною; г) внесок інших струмів, крім натрієвого, в момент досягнення  $\max V$  повинен бути дуже малим. На сьогодні використовують пряме вимірювання натрієвого струму в ізольованих кардіоміоцитах за методом patch-clamp, який дозволяє реєструвати інтегральний струм від цілої клітини, реєструвати струми поодиноких каналів, вивчати дію препаратів при їх впливі на зовнішню та внутрішню сторони плазматичної мембрани, досліджувати електрофізіологічні характеристики клітин невеликих розмірів (близько 10 мкм). Реєстрація струму виконується від електрично ізольованого фрагменту плазматичної мембрани за допомогою щільно притисненої до поверхні клітини скляної піпетки; загальне обладнання, необхідне для досліджень методом patch-clamp: 1) інвертований мікроскоп; 2) петч-посилувач – ЕРС-5, ЕРС-7, РОК-3 та ін; 3) пристрій для вводу речовин з експериментальною ванночкою; 4) мікроманіпулятор; 5) пристрій для витягування і оплавлення мікропіпеток; 6) стимулятор; 7) осцилограф; 8) магнітограф; 9) ЕОМ. Реакція відповіді кардіоміоцитів на антагоністи кальцію також залежить від величини мембранного потенціалу, а методи реєстрації кальцієвого струму лише незначною мірою відрізняються від згаданих вище. Деякі блокатори кальцієвих каналів також мають антиаритмічну дію. Але вони в деяких випадках надто сильно гальмують електричну активність міокарда.

Вивчають вплив сполук на потенціал спокою, потенціал дії у міокардіальних клітинах різних відділів серця, максимальну швидкість деполяризації ( $V_{\max}$ ), пороговий та максимальний діастолічний потенціали, тривалість потенціалу дії на різних рівнях реполяризації, ефективний, відносний та функціональний рефрактерний періоди. Прямий вимір іонних струмів кардіоміоцитів дозволяє визначити, на які вхідні (швидкий натрієвий або повільний кальцієвий) або вихідні (калієві) струми діє досліджувана сполука. Крім того, важливо знати не тільки на який струм діє сполука але й на яке місце в каналі, в якому стані перебуває канал (відкритому, закритому, активованому, інактивованому).

### ***3.20: Вплив на трансмембранні потенціали (спокою, дії) та діяльність кардіоміоцитів із застосуванням стандартної мікроелектродної техніки***

Для відведення потенціалів застосовують мікроелектроди з діаметром кінчика 0,5 мкм і опором 30–40 мОм. Об'єктами дослідів є смужки міокарда шлуночків (5x10 мм) жаби *Rana temporaria*, які вміщують в камеру і перфузують при 20°C з розчином Рінгера (такого складу, мМ/л: NaCl 110, KCl 2,5, CaCl<sub>2</sub> 1,8, NaHCO<sub>3</sub> 2,4, рН 7,3).

Можна проводити дослідження на папілярному м'язі мурчака. Папілярний м'яз вміщують в проточну камеру, де проводять перфузію з постійною швидкістю (18 мл/хв) розчином Кребса-Хенселяйта (такого складу, мМ/л NaCl 113,8, CaCl<sub>2</sub> 3,2, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1,2, KCl 4,7, MgSO<sub>4</sub> 1,2, глюкоза – 10,0), підтримують рівень кисню 95%, CO<sub>2</sub> 5%, рН 7,4, 35°C). У папілярному м'язі укріплюють біполярний електрод (Ag/AgCl), за допомогою якого наносять стимули порогової інтенсивності (мВ), різної частоти (1 та 3 Гц). Трансмембранні потенціали реєструють за допомогою скляних мікроелектродів, які заповнені KCl (3 мМ/л) з опором 10–25 мОм. Після посилення потенціали подаються на осцилоскоп та реєструються у реальному часі після аналого-цифрового перетворення. Вимірюють такі параметри: RP – потенціал покою (мВ), OV – овершут (мВ),  $V_{\max}$  – максимальна швидкість приросту потенціалу дії, CT – час проведення, АРД90 –

тривалість потенціалу дії при 90% реполяризації (мс). Ефективний рефрактерний період (ERP) вимірюють із застосуванням додаткового стимулу, що дорівнює подвійному пороговому, відносний рефрактерний період (RRP) визначають як найменшу різницю між тривалістю відповідей у фазі кінцевої реполяризації. Подібні дослідження проводять на смужках міокарда жаби.

Для вивчення електрофізіологічного впливу в дослідах на собаках тварин наркотизують, інтубують, переводять на штучне дихання, фіксують на операційному столі на правому боці. В асептичних умовах розтинають грудну клітку в 4-му міжребір'ї ліворуч. Надрізають перикард, виділяють низхідну гілку лівої артерії, розташовану нижче краю вушка лівого передсердя. Паралельно артерії накладають ін'єкційну голку №20. Першу лігатуру зав'язують на голці, що створює перешкоду циркуляції крові в нижній ділянці міокарда. Через 30 хв зав'язують другу лігатуру. В яремну вену вводять поліетиленовий катетер, кінці якого виводять на шию собаки та фіксують. Тварин, що вижили, беруть в експеримент. На 2–4 добу у тварин проводять електрофізіологічні дослідження. Після нембуталової анестезії, тварин інтубують, проводять штучну вентиляцію легенів. По операційному шву знову розтинають грудну клітку, дозволяють здійснити доступ до пошкодженого міокарда. Через стегнову артерію вводять зонд-електрод, який встановлюють в усті аорти та за його допомогою реєструють біполярну електрограму пучка Гіса. Інший біполярний електрод у вигляді затиску закріплюють на вушку лівого передсердя. За його допомогою реєструють електрограму і проводять електростимуляцію лівого передсердя. Третій біполярний електрод з відстанню між електродами 5 мм занурюють в товщу міокарда лівого шлуночка в ділянці нормального (неінфарзованого) міокарда в зоні, близької до вушка передсердя. За допомогою цього електрода реєструють електрограму лівого шлуночка, проводять його електростимуляцію. За електричною активністю серця спостерігають за допомогою монітора комп'ютера, заносять в пам'ять зовнішню електрограму в відведеннях I, II, III та електрограми серця. Зовнішня електрограма відтворюється при фільтрації сигналу 0–250 Гц, електрограма пучка Гіса – 60–400 Гц, міокардіальна електрограма – 100–400 Гц. Тривалість прямокутних імпульсів – 2 мс. При цьому можна проводити:

1. Часту стимуляцію передсердь переривчастими імпульсами між серіями з 20 імпульсів.
2. Стимуляцію передсердь поодинокими передчасними імпульсами на фоні базисного ритму.
3. Стимуляцію шлуночків поодинокими передчасними імпульсами на фоні базисного ритму.
4. Стимуляцію шлуночків парними передчасними імпульсами на фоні базисного ритму.
5. Можливі інші методи стимуляції шлуночків.

На електрокардіограмі визначають інтервали PP, PQ, QT, комплекс QRS, інтервал PA (час від зубця P до першої швидкої високоамплітудної осциляції передсердь), інтервал AH (час від початку швидкої високоамплітудної осциляції передсердь до осциляції пучка Гіса), інтервал HV (час від початку осциляції пучка Гіса до початку збудження шлуночків), мінімальну тривалість циклу стимуляції передсердь (CL 1: 1), час відновлення функції синусового вузла (SNRT). Під час стимуляції передсердь і шлуночків визначають ефективний рефрактерний період передсердь (ERPA), функціональний рефрактерний період передсердь (FRPA), загальний рефрактерний період передсердь (TRPA), відносний рефрактерний період передсердь (RRPA), ефективний рефрактерний період АВ вузла (ER-PAVN), функціональний рефрактерний період АВ вузла (FRPAVN), загальний рефрактерний період системи Гіса-Пуркіньє, ефективний рефрактерний період шлуночків (ERP<sub>N</sub>), функціональний рефрактерний період шлуночків (FRP<sub>N</sub>). При електростимуляції шлуночків визначають види спонтанної ектопічної активності: повторну відповідь шлуночків (RR), нестійку шлуночкову тахікардію (VTNS), стійку шлуночкову тахікардію (VTS), фібриляцію шлуночків (VFb). Під час розвитку фібриляції шлуночків або стійкої шлуночкової тахікардії, яка не купірується електростимуляцією шлуночків, веде до стійких гемодинамічних наслідків, проводять електроімпульсну терапію (DS shock). При цьому енергію імпульсу підбирають з 1,0 RW, щоб визначити поріг дефібриляції. Якщо це відбувається до введення препарату, то після відновлення нормального ритму чекають не менше 20 хвилин, контролюють значення ERPV. Після контрольного дослідження вводять препарат.

Протягом 60 хв через кожні 5 хв вимірюють інтервали ЕКГ та електрограми пучка Гіса. При введенні сполуки в двох дозах другу вводять не менше ніж за годину після першої.

### 3.21. Інші методи дослідження антиаритмічної активності

З метою прогнозування антиаритмічної активності проводять також біохімічні та фізико-хімічні дослідження протиаритмічних засобів. Загальноприйнятими методами встановлюють здатність протиаритмічних засобів попереджувати зниження компонентів аденілової системи, аденілатного заряду, спотворення тканинного дихання та окислювального фосфорилування, рівня нікотинамідних коферментів, підвищення показників перекисного окислення ліпідів (малонового діальдегіду, основ Шифа, дієнових кон'югатів та ін.), показників антиоксидантного захисту (активність супероксиддисмутази, каталази, глутатіонпероксидази, глутатіонредуктази, вмісту відновленого глутатіону, церулоплазміну), коригувати активність ферментів сукцинатдегідрогенази, лактатдегідрогенази, малатдегідрогенази, аспартатамінотрансферази, аланінамінотрансферази та ін. Антиаритмічна активність сполук залежить також від їхньої здатності створювати комплекси з ліпідами, білковими і вуглеводним компонентами біомембран, а також мембранозв'язаними компонентами біометалів і аденініпуклеотидами, вимірювати рухомість ліпідного бішару мембрани, застосовуючи флуоресцентні зонди. Запропоновані методи математичного моделювання і прогнозування антиаритмічної активності нових сполук: при хлоркальцієвій аритмії – терапевтичний індекс У1 і аконітиновій – У2 моделях. Модель прогнозу розраховується за допомогою констант стійкості комплексу сполук з фосфатидилхоліном, холестеринном, глюкозаміном, цистеїном, метіоніном, кальцієм, магнієм і АТФ (Методичні рекомендації «Засоби, що застосовують для лікування порушень серцевого ритму», Запоріжжя, 1991).

Для вивчення механізму дії дослідних сполук вивчають зв'язок з рецепторами натрієвих, кальцієвих, калієвих каналів, мускариновими холінорецепторами ( $M_1$ ,  $M_2$ ), адренорецепторами ( $\alpha_1$ ,  $\alpha_2$ ,  $\beta$ ), дофаміновими рецепторами ( $D_2$ ), ГАМК-рецепторами, гістаміновими рецепторами, серотоніновими, аденозинновими та ін. Вивчають константи зв'язування сполуки з цими рецепторами та інші фізико-хімічні параметри.

Вивчають вплив сполук на активність аденілатциклази та фосфоінозитольну систему, можливе визначення вмісту цитокінів.

Обов'язковим є вивчення впливу антиаритмічних засобів у дослідах на наркотизованих собаках, кішках, кролях, щурах на кардіо- і системну гемодинаміку. Особливо важливо вивчити вплив речовин на скоротливу функцію міокарда, ударний хвилинний об'єм крові, артеріальний тиск, загальний периферичний судинний опір. У зв'язку з тим, що значна кількість протиаритмічних засобів пригнічує скоротливу активність міокарда, важливо визначити ступінь пригнічення. Це також стосується ступеня впливу нової сполуки на частоту серцевих скорочень і функцію провідності.

Рекомендований перелік методів дозволить визначити сполуки, які за спектром і характером дії можуть бути запропоновані для клінічних випробувань як антиаритмічні сполуки. Під час клінічних досліджень може виникнути необхідність у проведенні додаткових експериментів з метою уточнення рекомендацій із застосування препарату в клініці.

## Література

1. Аммар Э.М., Кудрин А.Н. Антиаритмическая активность  $\beta$ -N-гексаметиленамино-п-бутоксипропиофенона (ТГ-17), новокаинамида и хицидина при аритмиях, вызванных строфангидином (К) у кошек//Фармакол. и токсикол.– 1969.– Т.32, №5.– С. 566– 569.
2. Веденеева З.И. Влияние наркотических средств и новокаина на экспериментальную сердечную аритмию//Фармакол. и токсикол.– 1955.– Т.18, №5.– С. 3–8.

3. Вольперт Е.И., Могилев А.М. Влияние строфантина и цитохрома-С на сократительную функцию миокарда, частоту шока и фибрилляции желудочков при экспериментальном инфаркте миокарда//Кардиол.– 1979.– Т.19, №1.– С. 93–98.
4. Данильчук І.В. Пошук протиаритмічних засобів серед похідних діамінодифенілу та дибензодіазепіну//Ліки.– 1997.– №6.– С. 79–81.
5. Костко З.С., Юнусов З.З., Касимходжаев А.Ш. Функциональное состояние миокарда во время стенокардии, вызванной изопроterenолом//Кардиол.– 1984.– Т.24, №3.– С. 95–99.
6. Львов М.В. Влияние некоторых фармакологических веществ на хлористобариевую аритмию у кроликов//Журн. эксперим. и клин. мед.– 1973.– Т.13, №6.– С. 24–28.
7. Мазаев А.В. и др. Состояние микроциркуляции при ишемии миокарда в эксперименте//Бюлл. ВКНЦ АМН СССР.– 1979.– Т.1.– С. 9–13.
8. Павлов В.Н. Аконитиновая аритмия как модель изучения нервной регуляции ритма сердца//Регуляция деятельности сердца и коронарного кровообращения: Тр. II Моск. мед. ин-та.– М., 1976.– Т.40, сер. физиология, вып.1.– С. 140–146.
9. Розенштраух Л.В., Ракова А.В. Микроэлектродное исследование аконитиновой модели фибрилляции сердца//Физиол. журн. СССР.– 1965.– Т.51, №9.– С. 1070–1079.
10. Столярчук А.А., Поп В.Ю. Влияние феникаберана, кордарона и лидокаина на течение экспериментального инфаркта миокарда//VI съезд фармакологов УССР «Фармакология: состояние и перспективы исследований»: Тез. докл.– Харьков, 1990.– С. 292–293.
11. Сторожук Б.Г. Противофибрилляторная активность некоторых антиаритмических средств при максимально высокой перевязке коронарной артерии и ее реперфузии у кошек//Фармакол. и токсикол.– 1985.– №3.– С. 47–48.
12. Титов В.Н., Шаргородский В.М. Параллельное изучение порогов фибрилляции и возбуждения желудочков сердца в эксперименте на животных//Кардиол.– 1977.– Т.17, №4.– С. 111–116.
13. Физиология и патофизиология сердца: Пер. с англ./Под. ред. Н.Сперелакиса: в 2-х т.– Л.: Медицина, 1988.– Т.1.– 624 с.
14. Юрвичус М.А., Розенштраух Л.В., Юшманова А.В. Формирование эктопического возбуждения в сердце под действием аконитина. Сообщение 1. Динамика входящего и выходящего мембранных токов//Кардиол.– 1980.– Т.20, №1.– С. 75–78.
15. Alles G.A., Ellis C.H. Comparative actions of certain compounds like alfa-fagorine//J. Pharmacol. Exp. Ther.– 1948.– V.94.– P. 416–425.
16. Ellis K.O., Bryant S.H. Aconitine-induced repetitive firing in frog skeletal muscle and the effect on cable properties//Life Sci.– 1973.– V.13, №11.– P. 1607–1622.
17. Ferrter J.R., Saunders J.H., Mendez C. A cellular mechanism for the generation of ventricular arrhythmias by acetyl-strophanthidin//Circ. Res.– 1973.– V.32.– P. 600–609.
18. Jennings R.B., Reimer K.A., Hill M.L., Majer S.E. Total ischemia in dog hearts, in vivo. 1. Comparison of high energy phosphate production, utilization and of adenin nucleotid catabolism in total ischemia in vivo, severe ischemia in vivo//Circ. Res.– 1981.– V.9.– P. 892–900.
19. Malinov M.R., Battle F.F., Malamud B. Nervous mechanisms in ventricular arrhythmias induced by calcium chloride in rats//Circ. Res.– 1953.– V.1.– P. 554–559.
20. Nayler W.J., Ferrary R., Williams A. Protective effect a pretreatment with verapamil, nifedipin and propranolol on mitochondrial function in the ischemic and reperfused miocardium//Am. J. Cardiol.– 1980.– V.46.– P. 242–248.
21. Schmidt I., Schitt O. Effect of aconitine on the sodium permeability of node of Ranvier//Pflugers. Arch.– 1979.– V.61.– P. 133–148.

## ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНЕ ВИВЧЕННЯ НОВИХ КАРДІОТОНІЧНИХ ЗАСОБІВ

Чекман І.С.,  
Мохорт М.А.,  
Горчакова Н.О.,  
Французова С.Б.,  
Зупанець І.А.,  
Серединська Н.М.,  
Антоненко Л.І.,  
Гриневич О.І.,  
Аршіннікова Л.Л.

### Вступ

Одним з основних патологічних процесів у серцево-судинній системі є недостатність серця – стан, при якому не забезпечується належне кровопостачання органів і тканин.

Цей стан вимагає певної фармакологічної корекції, принципами якої є:

- посилення скоротливої функції серця;
- усунення диспропорції між силою скорочень міокарда та позасерцевими гемодинамічними факторами, які визначають об'єм надходження до серця крові (переднавантаження) та викиду крові (післянавантаження);
- лікарська корекція обмінних процесів;
- регуляція обсягу позаклітинної рідини і електролітичного балансу організму.

Для лікування серцевої недостатності (СН) використовують великий обсяг фармакологічних препаратів різних механізмів дії та хімічної природи.

Одним з основних засобів фармакотерапії СН є так звані кардіотонічні засоби, фармакологічна дія яких зводиться до нормалізації гемодинамічних процесів за рахунок посилення (збільшення) сили та швидкості скорочення серцевого м'яза (позитивний інотропний ефект).

Ці препарати, як правило, не спричиняють значного збільшення споживання кисню і впливу на метаболізм міокарда. Вони можуть бути використані при гострій та хронічній СН.

### 1. Загальні вимоги до кардіотонічних препаратів та методів їх вивчення

Відповідно до запитів кардіологічної клініки головними вимогами до сучасних кардіотоніків є:

- посилення сили та швидкості скорочення міокарда без значного збільшення споживання кисню;
- покращання процесу розслаблення серцевого м'яза;
- уповільнення частоти скорочень серця (або незначна хронотропна дія);
- відсутність аритмогенних властивостей та ін. токсичних впливів на організм;
- зменшення загального периферичного судинного опору;

## Оцінка специфічної фармакологічної активності лікарських засобів

- покращання показників коронарного, ниркового, мезентеріального кровообігу;
- висока ефективність при різних шляхах введення;
- можливість комбінування з іншими препаратами для лікування СН.

Гетерогенність розглянутої групи препаратів (за хімічною будовою, виразністю, тривалістю і механізмами реалізації позитивного інотропного ефекту), складності патогенезу СН і відсутність легко відтворюваних та адекватних їй моделей значно ускладнює вирішення питання про цінність досліджуваної фармакологічної сполуки як кардіотонічного засобу. Цими ж причинами обумовлено велике число різноманітних методів та їх модифікацій, які використовують для первинної оцінки та поглибленого вивчення потенційно кардіологічних препаратів. Останнє суттєво ускладнює трактування отриманих результатів і порівняння відносної активності препаратів, вивчених в різних лабораторіях. Тому, разом з уніфікацією застосованих методик, на зразок необхідності виділення з усієї їх різноманітності найбільш доступних, адекватних, високочутливих, специфічних і відтворюваних, що можуть бути рекомендовані для використання при цілеспрямованому відборі та фармакологічному вивченні кардіотонічних речовин.

Аналіз сучасного рівня знань про механізми дії відомих лікарських засобів і патогенез різних форм СН показують, що єдиним стійким критерієм, який дозволяє розглядати хімічну речовину як потенційний кардіотонік, є наявність у нього інотропного ефекту\*.

Відповідно до цього сучасна програма пошуку і доклінічної оцінки кардіотонічних засобів може бути подана таким чином.

1 етап: первинний відбір (скринінг) і первинна оцінка потенційних кардіотонічних засобів.

Головною метою цього етапу є виявлення у досліджуваних сполуках здатності збільшувати силу та швидкість скорочень препаратів міокарда (див. пп.2, 2.1–2.3). Крім цього, визначають вибірковість їх позитивного інотропного ефекту (п.2.4) і орієнтовні параметри токсичності (п.2.5). Оцінку ефективності відібраних речовин проводять, порівнюючи їх інотропну (SE<sub>50</sub> інотроп., SE макс. інотр., SE мін. інотр.) і хронотропну (SE<sub>50</sub> хр., SE мін. хр.) активності, а також токсичність (LD<sub>50</sub>) з одним із добре вивчених («сталонних») препаратів – строфантином G, дигоксином, ізопротеренолом (ізадрином), дофаміном, теофіліном і т.п.

2 етап: вивчення впливу потенційно кардіотонічних сполук на скоротливу активність міокарда і параметри гемодинаміки в умовах цілісного організму.

На цьому етапі проводять оцінку впливу досліджуваних сполук на продуктивність серця (п.3.1), скоротливу активність (п.3.2) і метаболізм міокарда.

3 етап: дослідження гемодинамічних і метаболічних ефектів кардіотонічних сполук за умов експериментальної СН.

Ефективність потенційно кардіотонічних сполук вивчають методами експериментальної терапії, моделюючи СН *in vitro* (п.5.1) і на лабораторних тваринах різних видів (5.2).

4 етап: вивчення інших видів активності, важливих для виявлення кардіотонічної дії досліджуваних сполук.

Передбачається виявлення антиаритмічної активності, дослідження впливу на параметри регіонального (в тому числі, і коронарного) кровообігу, обміну води і електролітів, кислотно-лужної рівноваги (п.6).

5 етап: вивчення нешкідливості препаратів, їх загальнофармакологічних властивостей (вплив на ЦНС, систему травлення, органи дихання, систему крові), головних параметрів фармакокінетики. Це вивчення проводять відповідно до вимог Державного фармакологічного центру МОЗ України.

Розробка лікарських форм препарату та НТД на субстанцію і лікарську форму.

Розшифрування основних механізмів дії нового препарату.

\* Масив сполук, що підлягає експериментальному вивченню, може бути обмежений шляхом прогнозування і попереднього виявлення кількісного відношення «структура-активність» (КССА) за методами конформаційного аналізу або за методом «сетів». Принцип і приклади практичного використання останнього див. // *Arzneimittel Forsch.* - 1981. - Bd.31-1, №1. - S. 130-140.



## 2. Методи виявлення позитивного інотропного ефекту на етапі первинного відбору потенційних кардіотонічних засобів

На етапі первинного відбору потенційно кардіотонічних препаратів слід враховувати те, що напруження (Р) і скорочення серцевого м'яза (1), які розвиваються, залежать від початкової довжини м'язового волокна та частоти серцевих скорочень. Пряма інотропна дія проявляється у збільшенні сили та швидкості скорочень серцевого м'яза. Але, враховуючи технічну складність даної методики, рекомендується на початковій стадії первинного відбору кардіотонічних засобів проводити дослідження на правих передсердях теплокровних, що мають здатність спонтанно скорочуватись.

### 2.1. Реєстрація скорочень ізольованого правого передсердя теплокровних, що спонтанно скорочується

Оцінку впливу досліджуваних сполук на вказаному етапі можна проводити на правому передсерді щурів, мурчаків, кролів, котів. Але найбільш простою та дешевою є методика виділення правого передсердя щурів.

Тварин обох статей масою 150–200 г знерухомлюють, швидко розтинають грудну клітку, перикард, виділяють серце і переносять на парафінову дошку і у ванночку, яка містить розчин Кребса-Хенселяйта (склад в 1 л дистильованої води: NaCl – 7,02 г, KCl – 0,356 г;  $\text{K}_2\text{H}_2\text{P}_2\text{O}_7$  – 0,164 г,  $\text{MgSO}_4$  – 0,3 г,  $\text{NaHCO}_3$  – 2,1 г), який має температуру 32°C та pH=7,3–7,4. Потім виділене передсердя розміщують у двостінній камері об'ємом 50 мл, у якій постійно циркулює розчин за допомогою водозливу. Розчин суміші, що постійно аерується, складається з 95% кисню та 5%  $\text{CO}_2$ , подається з боку внутрішньої камери під підвищеним тиском з основного резервуару через скляну теплообмінну спіраль з термостатичним контрольованим підігрівом. Один кінець препарату обережно фіксують на нерухомому гачку за допомогою серфіни, інший за допомогою пружини з'єднують з важелем механотрону – механоелектричного перетворювача сили. При фіксації ізольований м'яз розтягується в 1,5 раза від початкової довжини (довжина спокою), що з біологічної точки зору необхідно для досягнення максимального скорочення смужки.

В установці для реєстрації скорочень препарату ізольованого передсердя використовують механотрон МХ-2С, підсилювач біопотенціалів УПБІ-02, ЕЛКАР-2, диференційований пристрій, вмонтований у ЕЛКАР, який дозволяє «розкласти» криву скорочень на скорочення і розслаблення в часі (установка може бути укомплектована іншим аналогічним обладнанням і модифікуватися персональним комп'ютером).

Перед початком дослідження проводять калібрування механотрону шляхом підвищення вантажу масою 500 мг та запису каліброваного сигналу. Така сама операція проводиться після завершення експерименту. Досліджувані речовини вводять в камеру в об'ємі 0,5 мл (співвідношення введених в камеру об'ємів і об'єму самої камери повинно бути 1:100) швидко і одночасно. Струмів введені речовини спрямовують до стінки камери, кінець голки шприца знаходиться на одному і тому ж рівні в усіх досліджах, що досягається шляхом натиску головки шприца у верхній кінець камери. pH поживного розчину реєструють до початку експерименту і в динаміці дослідження. Відмивання препарату виконують шляхом повного 3-разового випорожнення камери з подальшим швидким її наповненням. Протягом 40–60 хв м'яз серця входить в стабільний ізотонічний режим (період вирацьовування). Охарактеризувати скоротливу діяльність за допомогою якого-небудь одного показника – індексу скоротливості – неможливо. Це положення стосується й вибору показників для оцінки скоротливості ізольованої смуги міокарда.

У серцевому м'язі (як і у скелетному) макроскопічні зміни відображають процеси, що відбуваються під час скорочення у актин-міозиновому комплексі, зокрема, міозинових місточках.

## Оцінка специфічної фармакологічної активності лікарських засобів

Сучасними дослідженнями доведено, що на основі змін на кінцях м'яза змінних – довжини ( $L$ ), швидкості ( $V$ ) та напруги ( $P$ ) як функції часу за допомогою моделі можна визначити властивості внутрішнього генератора сили та укорочення. Найдокладніше вивчено співвідношення довжина-сила ( $I-P$ ), яке є основою закону Франка-Старлінга, і зв'язок сила-швидкість ( $P-V$ ), який визначається особливостями переходу хімічної енергії в механічну. В багатьох працях (особливо фармакологічних) для оцінки скоротливої здатності міокарда при ізометрії використовують амплітуду скорочень, вважаючи, що зміни в максимальній силі пропорційні відмінностям у кількості кальцію, що надходить до міофібрил при активації. Але амплітуда скорочень залежить від двох факторів: швидкості розвитку напруги  $dp/dt$  і часу, протягом якого може відбутися наростання сили. Тому більш точно визначити можливості контрактильного елемента, здатність його реалізувати свій скоротливий резерв можна тільки за сукупністю зв'язків  $P(t)$ ,  $V(t)$ ,  $I(t)$ ,  $P(V)$ ,  $P(I)$ .

Після закінчення періоду впрацьовування м'яза проводять вивчення впливу на нього різних механічних чинників, які використовуються безпосередньо в кожному експерименті і могли б діяти на препарат ізольованого м'яза. До цих чинників належать:

- триразове відмивання м'яза з інтервалом 3 і 5 хв;
- закриття протоку оксигенованого розчину через камеру на час, необхідний для експозиції досліджуваних речовин. Досліди проводяться за схемою, представленою у таблиці.

Таблиця

№	Етапи дослідження	Тривалість
1	Період впрацьовування	40-60 хв
2	Відмивання	10 с
	«Відпочинок»	3 хв
3	Відмивання	10 с
	«Відпочинок»	3 хв
4	Відмивання	10 с
	«Відпочинок»	15 хв
5	Закриття протоку	2 хв
6	Проток відкритий	реєстрація через 5 хв

Оцінку впливу досліджуваних сполук на ізольоване праве передсердя проводять за такими параметрами, наведеними на рис. 1.

При виявленні збільшення амплітуди, швидкості скорочення передсердя, збільшення швидкості розслаблення при незмінній ЧС або її сповільненні (принциповий незначний хронотропний ефект) слід перейти до реєстрації прямої інотропної дії сполук, що вивчаються, яка не залежить від змін ЧС і обумовлена реалізацією феномена Франка-Старлінга.

Як існують міжвидові розходження в реакціях на інотропні агенти, так мають місце достатньо глибокі розходження в таких реакціях і між передсерддями та шлуночками одного серця. Тому імовірність виявлення кардіотонічного ефекту значно підвищується при

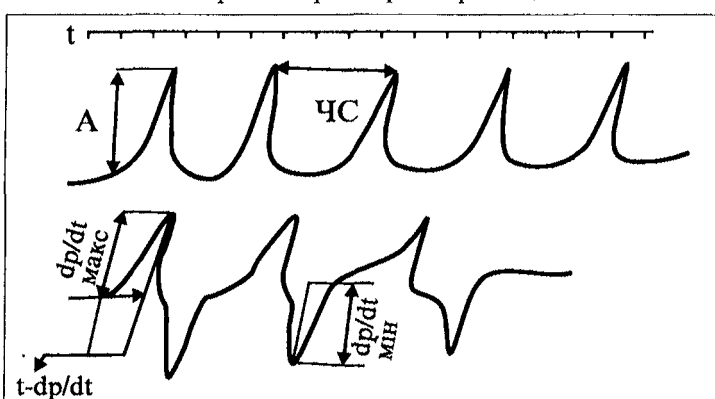


Рис. 1. Графічне зображення параметрів скорочень правого передсердя

- А – амплітуда (сила) скорочень передсердя;
- $dp/dt$  макс. – швидкість скорочень передсердя;
- $dp/dt$  мин. – швидкість розслаблення передсердя;
- Т –  $dp/dt$  – час активації скорочень;
- ЧС – частота скорочень.

одночасній реєстрації інотропного ефекту на препаратах різних відділів серця. При цьому доцільне використання багатоканальних мікромеханографічних установок, що зменшує не тільки кількість тварин, а й час, витрачений на дослідження.

## **2.2 Реєстрація скорочень ізольованих препаратів серцевого м'яза в ізометричному режимі**

Препарати серцевого м'яза розміщуються у термостатованій перфузійній камері з органічного скла. Об'єм кожної з чарунок – приблизно 1 см<sup>3</sup>. Швидкість перфузії – приблизно 5 мл/хв.

Кожен препарат одним кінцем прикріплюють до нерухомого гачка, а іншим жорстко фіксують до важеля механоелектричного перетворювача сили – механотрона. Початкове розтягнення препарату (переднавантаження) виконується за допомогою спеціального мікрометричного пристрою. Для визначення довжини робочої частини м'яза камера повинна бути обладнана оптичною системою, яка дозволяє проводити заміри з точністю до 0,01 мм. Стимуляцію препаратів виконують надпороговими прямокутними імпульсами від електростимулятора.

Платинові пластинчаті електроди для безконтактної стимуляції розташовують на стінках камери вздовж її поздовжньої осі. Для зменшення вивільнення ендогенних катехоламінів можуть бути використані голчаті платинові електроди. Силу (F макс) і напруження спокою (T<sub>0</sub>), котрі розвиваються кожним препаратом та вимірюються за допомогою механотронів, після посилення та диференціації реєструють разом з першою похідною (F макс) на осцилографі і швидкодіючому реєструючому пристрої з чорнильним, струменевим або іншим типом запису. Швидкість реєстрації повинна бути не менше 100 мм/с. Технічне оформлення установки залежить від типів використаних пристроїв.

## **2.3. Основні параметри ізометричного скорочення ізольованих препаратів серцевого м'яза**

Оцінку впливу досліджуваних сполук на ізольовані препарати серцевого м'яза, який скорочується в ізометричному режимі, проводять за такими параметрами (рис. 2).

F макс. – максимальна сила, що розвивається. Відповідає розміру перпендикуляра ab. Виражається в мН. Оцінка абсолютної сили скорочень різних препаратів за умов ізометричного режиму повинна проводитись при порівнянні величин максимального ізометричного напруження (T<sub>макс</sub>), яке чисельно дорівнює F<sub>макс</sub>, нормованої на площу поперечного перерізу м'язового препарату. Через те, що переріз має неправильну форму, смуга апроксимується циліндром довжиною l. Як показник довжини використовують l<sub>макс</sub> – довжину препарату, при якій сила ізометричного скорочення максимальна. Тоді площу перерізу можна знайти за рівнянням:

$$S = \frac{M}{ld}, \text{ де}$$

M – маса м'яза (г);

l – l<sub>макс</sub>;

d – питома маса (для міокарда – 1,07 г/мм<sup>3</sup>).

Для оцінки інотропних ефектів досліджуваних сполук на етапі скринінгу допустиме вираження змін показників у відносних одиницях (наприклад, в % щодо початкового рівня).

Як правило, через тривалість експерименту спостерігаються певні коливання параметрів ізометричного скорочення препаратів міокарда теплокровних тварин. Тому можна порекомендувати методику, що передбачає вираження ефекту, обумовленого кожною концентрацією препарату, у % до максимального, визначеного після впливу агента з надмірною концентрацією (10<sup>-2</sup>–10<sup>-4</sup>).

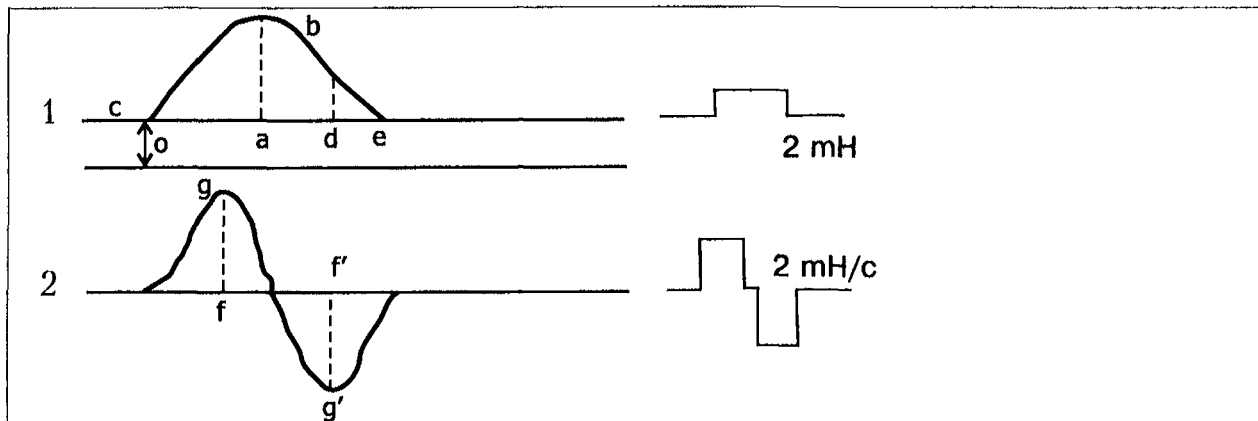


Рис. 2. Основні параметри скорочення та розслаблення серцевого м'яза.

1 – крива сили ізометричного скорочення; 2 – перша похідна.

+Tмакс – максимальна швидкість скорочення. Визначається шляхом диференціювання ( $dT/dt$ ) і відповідає перпендикуляру  $fg$ . Розмірність –  $mH/mm^2 \cdot c^{-1}$ ;

-Tмакс – максимальна швидкість розслаблення. Відповідає величині перпендикуляра  $f'g'$ . Розмірність –  $mH/mm^2 \cdot c^{-1}$ .

Ці показники зручно виражати, нормуючи їх на величину максимально розвинутої сили:  $+F'/F$ ,  $-F'/F$ . То – напруження спокою. Дорівнює напруженню м'яза після розтягування його до  $l_{макс}$ . Відповідає перпендикуляру  $ic$ . Розмірність –  $mH/mm^2$ .

Серед багатьох інших показників найбільше значення мають:

ЧДМ – час досягнення максимальної сили ізометричного скорочення. Відповідає відрізку  $ca$  і виражається в секундах (с).

ЧР – час розслаблення. Відповідає відрізку  $ac$ . Розмірність – секунда (с).

Більш інформативним показником є  $1/2$  ЧР – час напіврозслаблення – час, за який величина розслаблення досягає 50%. Відповідає відрізку  $ad$ . Розмірність така сама.

#### 2.4. Вивчення впливу досліджуваних сполук на параметри ізометричного скорочення препаратів серцевого м'яза теплокровних тварин

Постановка масових досліджень на початковому етапі можлива лише за умов застосування простих та економічних методів первинного відбору кардіологічних сполук. Таким вимогам відповідає методика реєстрації ізометричного скорочення ізольованих препаратів міокарда теплокровних тварин.

Для випробування сполук глікозидної природи використовують мурчаків. При дослідженнях сполук інших хімічних класів досліди проводять на ізольованих препаратах серцевого м'яза ссавців не менше двох біологічних видів (щури, мурчаки, кролі, коти).

В експериментах можуть бути використані папілярні м'язи, трабекули, смужки шлуночків та лівого передсердя. Препарати правого передсердя, які мають власну ритмічну активність, на даному етапі не застосовують. При роботі на багатоканальній мікромеханографічній установці раціонально одночасно використовувати препарати з різних відділів одного серця (наприклад, папілярний м'яз, смужки міокарда лівого передсердя та шлуночки). Зручним об'єктом є міжшлуночкова перетинка серця кроля, що перфузується через артерію.

Параметри скорочень препаратів міокарда теплокровних тварин дуже чутливі до дії різних факторів (рН, концентрація іонів, температура, інтенсивність оксигенації і т.п.), показників яких слід дотримуватися від досліду до досліду.

У тварин під наркозом (пентобарбітал, уретан) виймають серце, яке фіксують у ванночці з охолодженням до  $20^{\circ}$  аерованим поживним розчином.

Папілярні м'язи у щурів виділяють з лівого, у мурчаків – з правого, у кролів і котів – з обох шлуночків.

Особливу увагу треба звернути на атравматичність виділення м'язових препаратів. Товщина смужки є лімітуючим фактором надходження кисню до її глибоких ділянок, а її «краєві ефекти», які вносять значну помилку при реєстрації ізометричних скорочень, тим більші, чим коротший препарат. Тому слід відбирати найтонші (менше 1 мм в діаметрі) та довгі папілярні м'язи, а смужки вирізати діаметром 1–1,5 мм і довжиною 6–8 мм.

Препарати закріплюють у перфузійній камері, як описано раніше (п.2.1). Час, витрачений на виділення та фіксацію препарату, не повинен перевищувати 3–4 хв. Перфузію здійснюють одним з вказаних розчинів\* (температура для препаратів міокарда щурів  $+28-30\pm 0,5^{\circ}\text{C}$ , для морських свинок  $+30-34^{\circ}\text{C}$ ). Швидкість перфузії – 5 мл/хв. Розчин аерують газовою сумішшю, що містить 95% кисню та 5% вуглекислого газу.

Препарати стимулюють прямокутними імпульсами тривалістю 3–5 мс і амплітудою, на 10–20% більшою за порогову. Частота визначається типом смужки, видом тварини, індивідуальними особливостями досліджуваного препарату та може варіювати в межах 0,2–4 Гц.\*\*

«Впрацювання» препарату триває 30–40 хв при мінімальному переднавантаженні. Робоче розтягнення у кожному випадку задається таким чином, щоб довжина препарату наближувалась до Імакс кривої Франка-Старлінга, тобто препарат розвиває максимальне напруження при даній частотній стимуляції. Для подальшої роботи слід використовувати лише ті м'язові препарати, відношення  $T_0/T_{\text{макс}}$  яких не перевищує 1/3.\*\*\*

При зміні частоти стимуляції слід підібрати адекватне їй початкове розтягнення і продовжити «впрацювання» препарату до досягнення нового стаціонарного рівня.

До початку дослідів досліджуваних сполук визначають чутливість препарату до «стандартних» інотропних агентів – ізопротеренолу (ізадрину) –  $1\cdot 10^{-8}$  М; строфантину G –  $1\cdot 10^{-7}$  М; дофаміну –  $1\cdot 10^{-5}$  М.

Препарати, які не реагують на дані речовини, з подальших досліджень виключаються.

Після досягнення початкового стаціонарного рівня скорочень для виявлення моменту початку дії досліджуваної сполуки, а також моменту досягнення нового стаціонарного рівня реєстрації параметрів скорочення м'язу проводять постійно на мінімальній швидкості розгортки (1 мм/с).

Смужки міокарда перфузують розчином з вмістом речовини з концентрацією  $10^{-9}$ – $10^{-2}$  М.\*\*\*\*

Якщо впродовж 10 хв досліджувана сполука не впливає на скоротливі властивості препарату міокарда, в подальшому для перфузії використовують розчин, в якому вміст даної сполуки на порядок вищий. Спостереження продовжують протягом наступних 10 хв. Залежно від отриманих результатів ефекти досліджуваних сполук вивчають у широкому діапазоні концентрацій ( $10^{-9}$ – $10^{-2}$  М).\*\*\*\*\*

\* Для препаратів серця щурів використовують розчин Кребса: NaCl – 120 мМ, KCl – 4,8 мМ,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  – 1,3 мМ,  $\text{MgSO}_4$  – 2,5 мМ,  $\text{NaHCO}_3$  – 25 мМ,  $\text{CaCl}_2$  – 2,6 мМ, глюкоза – 5,34 мМ, pH – 7,4. Для препаратів серця мурчаків – розчин Тіроде: NaCl – 118,4 мМ, KCl – 4,9 мМ,  $\text{CaCl}_2$  – 2,5 мМ,  $\text{NaHCO}_3$  – 25 мМ,  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  – 1,2 мМ,  $\text{MgCl}_2$  – 1,2 мМ, глюкоза – 10 мМ, pH – 7,4. Для інших видів тварин застосовують різні модифікації вказаних розчинів.

\*\* Доцільно випробувати кожен сполуку, використавши різні частоти.

\*\*\* Див. Биков Б.Л., Желамський С.В.//Физиол. журн. СССР.– 1982.– Т.64, №3.– С. 425–428.

\*\*\*\* Необхідну кількість речовини зважують з точністю до четвертого знаку, розчиняють до одержання концентрації  $10^{-3}$ – $10^{-2}$  М. Для нерозчинних у воді сполук використовують відповідні неполярні розчинники, які повинні бути додані в еквівалентній кількості до перфузійного розчину. Потім за методом серійних розведень отримують розчини концентрації  $10^{-4}$ ,  $10^{-5}$ ,  $10^{-6}$  М і т.д.

\*\*\*\*\* При роботі на багатоканальному пристрої кожен препарат може перфузуватись окремо. У цьому випадку одночасно можуть бути використані розчини різних концентрацій.

Якщо ця сполука в одній з пробних концентрацій виявляє позитивний інотропний ефект, перфузію препарату з більш високою дозою речовини починають на висоті дії попередньої. У цьому випадку концентрація послідовно підвищується в 3, 10, 30, 300 і т.д. разів, доки величина позитивного інотропного ефекту продовжує збільшуватися.

Інший методичний підхід передбачає відмівання препаратів упродовж 15–30 хв (до постійного рівня скорочень) після вивчення досліджуваної речовини у кожній з концентрацій.

Вивчаючи вплив фармакологічних сполук на кінетику ізометричного скорочення і розслаблення у теплокровних, визначають не тільки максимальне напруження ( $T_{\text{макс}}$ ), що розвивається, і максимальну швидкість ( $T'_{\text{макс}}$ ), а й інші параметри, розглянуті у розділі 2.3.

Статистичну обробку результатів проводять загальноприйнятими методами на підставі даних не менше ніж 5 експериментів на однорідних препаратах (папілярні м'язи, ліве передсердя або смужки шлуночків) сердець тварин одного виду.

З метою оцінки ефективності досліджуваних сполук обчислюють їх  $SE_{50}$  (концентрація, яка підвищує  $F_{\text{макс}}$  на 50%).\* Для визначення  $SE_{50}$  будують болограми або накопичувальні криві.

$SE_{50}$  чисельно дорівнює константі Міхаеліса комплексу агоніст-рецептор ( $K_m$ ), яка може бути мірою активності досліджуваних сполук, можливо здатних зв'язуватися з певними клітинними рецепторами.

Більш наочною характеристикою взаємодії агоніста і рецептора є константа спорідненості ( $K_s$ ) – величина, зворотна до  $K_m$ .  $K_s$  може бути визначена як з  $K_m$ , так і безпосередньо з графіку Лайньюївера-Берка.\*\*

Відбір сполук для подальшого експериментального вивчення проводять, в першу чергу, порівнюючи  $SE_{50}$  досліджуваних та «еталонних» сполук.

Еталоном для кардіотоніків глікозидної природи є строфантин G або дігосин, для адреноміметиків – ізадрин, дофамін, добутамін. Позитивну інотропну дію кардіотоніків, які належать до інших хімічних груп, порівнюють з ефектами одного з еталонних препаратів, а також з найближчим «хімічним аналогом».

Обов'язковим є порівняння  $SE_{50}$ , обчисленої на основі даних, отриманих у тварин як мінімум 2 біологічних видів, один з яких – мурчаки.

У деяких випадках для порівняння ефективності еталонних і досліджуваних кардіотоніків корисно порівнювати величини їх мінімальних і максимальних інотропних концентрацій ( $SE_{\text{мін. інотр.}}$ ,  $SE_{\text{макс. інотр.}}$ ). Для узагальненої характеристики може слугувати величина  $tg\alpha$ , яка є відношенням  $K_{\text{макс.}}/U_{\text{макс.}}$ , де  $U_{\text{макс.}}$  – максимальне значення ефекту, який знайдено за графіком, накресленим у координатах Лайньюївера-Берка.

Збільшення  $tg\alpha$  означає зменшення спорідненості досліджуваної речовини до можливого рецептора і/або зменшення максимального ефекту.

На другому етапі доклінічного вивчення повинні бути досліджені не тільки більш ефективні, але й менш токсичні (велике значення мають  $LD_{50}$ ), ніж відомі кардіотоніки, сполуки.

### 2.5. Визначення вибіркової інотропної дії потенційних кардіотонічних сполук

Про вибірковість (селективність) позитивної дії судять за коефіцієнтом  $SE_{50} \text{ інотр.} / SE_{50} \text{ хрон.}$ , де  $SE_{50} \text{ інотр.}$  – концентрація речовини, яка викликає збільшення  $F_{\text{макс.}}$  на 50%, а  $SE_{50} \text{ хрон.}$  – концентрація речовини, яка викликає збільшення на 50% частоти скорочень ізольованого правого передсердя, що спонтанно скорочується, серця тварин того ж виду. Реєстрацію впливу досліджуваних речовин на частоту скорочень проводять аналогічно п.2.4, але смужки правого передсердя не піддають електростимуляції.

Перспективними для подальшого вивчення є сполуки, коефіцієнт селективності яких менше 1.

\* За необхідності обчислюють цю величину для тимчасових і швидкісних параметрів ізометричного скорочення.

\*\* Див. Комиссаров И.В. Элементы теории рецепторов в молекулярной фармакологии. – М.: Медицина, 1969. – С. 33–35.

## 2.6. Визначення орієнтовної токсичності досліджуваних сполук

При виявленні кардіотонічної активності у досліджуваних сполук у дослідах на ізольованих препаратах серця необхідно експрес-методом визначити  $LD_{50}$  в дослідах на мишах або щурах при внутрішньочеревному (для нерозчинних у воді речовин – пероральному) введенні.

При виявленні кардіотонічної активності досліджуваних сполук за умов цілісного організму необхідно провести повні дослідження з визначення їх токсичності на 3 видах лабораторних тварин, у тому числі на крупних лабораторних тваринах при ентеральному і парентеральному (включаючи внутрішньовенне при наявності розчинних у воді сполук) шляхах введення.

## 3. Методи оцінки впливу досліджуваних сполук як потенційних кардіотонічних засобів на скоротливу функцію міокарда та параметри гемодинаміки в дослідах *in vivo*

Показником дії кардіотонічних засобів є стан (зміна) скоротливої функції міокарда, яка є головною характеристикою функціонування серця в нормі і за патології.

На сучасному рівні методичних можливостей необхідно реєструвати прямі показники – силу і швидкість скорочення та розслаблення міокарда в динаміці. Динамічна реєстрація прямих показників тим більш необхідна, враховуючи особливості внутрішньо- і екстракардіальних механізмів компенсації і адаптації у відповідь на інотронний вплив, а також особливості перебігу СН.

Крім реєстрації основних показників скоротливої функції міокарда доцільно проводити розрахунок індексів скоротливості.

Поряд з показниками скоротливої функції міокарда, необхідна реєстрація показників продуктивності серця (ударного і хвилинного об'єму крові), а також гемодинамічних показників: артеріального тиску (сistolічного, діастолічного і середнього), загального периферичного опору судин і частоти серцевих скорочень.

Такий комплекс даних отримують при одночасній катетеризації порожнин серця, магістральних судин експериментальних тварин, що дозволяє скласти досить повне уявлення про кардіотонічні властивості досліджуваних засобів і перспективи їх подальшого вивчення.

### 3.1. Методи оцінки скоротливої функції міокарда

Сучасний рівень методичних можливостей дозволяє проводити пряму реєстрацію основних показників скоротливої активності міокарда: величини внутрішньощлуночкового тиску ( $p$ ), швидкості скорочення та розслаблення (відповідно  $dp/dt_{max}$  і  $dp/dt_{min}$ ) міокардіальних волокон, які в комплексі з іншими важливими гемодинамічними параметрами (системний артеріальний тиск, ЧСС, хвилинний об'єм) дають достатньо об'єктивну характеристику інотропного стану міокарда.

При значних змінах гемодинамічних детермінант додатково до отриманих величин пропонується розраховувати так звані ізоволюмічні індекси скоротливості, зокрема індекс  $\frac{dp/dt_{max}}{Pp}$  (Veragut, Kraeynbuhl, 1965), а також індекс розслаблення міокарда  $\frac{dp/dt_{min}}{Pp}$ .

Вказані індекси мало залежать від змін притоку крові до серця і тиску в аорті (перед- та постанавантаження).

Вивчення кардіотонічної активності нових сполук проводять на крупних лабораторних тваринах (собаках, котах, кролях). Бажано, а у деяких випадках – (при змінах під впливом досліджуваних сполук системного артеріального тиску) необхідно проведення експерименту на ненаркотизованих тваринах. Враховуючи особливості функціонування серцево-судинної системи у різних видів тварин, а також особливості перебігу різних стадій наркозу у них, найбільш доцільним уявляється проводити експерименти на собаках, які найбільш придатні до дослідження без наркозу.

Тварин кладуть на спеціальний стіл у положенні на спині, фіксують м'якими джгутами і вводять катетери у порожнину лівого шлуночка серця, в низхідну частину дуги аорти, порожнину правого шлуночка через сонні артерії і яремну вену (при проведенні експериментів на ненаркотизованих тваринах виділення сонних артерій і яремної вени здійснюють під місцевою анестезією – 0,5% розчином новокаїну).

Тиск у порожнинах серця і судинах вимірюють електроманометричним методом, швидкості скорочення і розслаблення міокарда – за допомогою електронного диференціатора. Обов'язковою є реєстрація системного (систоличного, діастолічного, пульсового та середнього) артеріального тиску. ЕКГ реєструють у стандартних відведеннях. Запис кривих повинен бути одночасним, синхронним, динамічним.

На основі аналізу кривих тиску крові у шлуночках серця, першої похідної, системного артеріального тиску, ЕКГ розраховують наступні величини (окремо для кожного шлуночка, рис. 3).

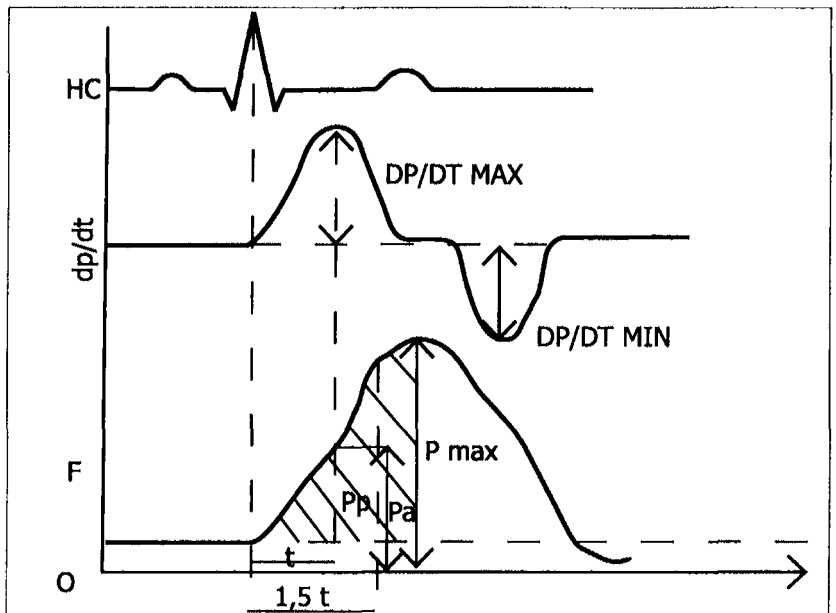
Як згадувалося вище, однією з умов, яка пред'являється до кардіотонічних препаратів, є вивчення процесів розслаблення, оскільки мобілізація скоротливої функції міокарда оптимально реалізується лише в комбінації з підвищенням інтенсивності розслаблення. Тому необхідні реєстрація і аналіз максимальної швидкості зниження тиску в шлуночках серця і розрахунок індексу розслаблення (відповідно  $dp/dt_{\min}$  і  $\frac{dp/dt_{\min}}{P_p}$  рис. 3).

На ЕКГ визначають частоту серцевих скорочень та інші загальноприйняті показники. За кривою артеріального тиску – систолічний, діастолічний, пульсовий і середній артеріальний тиск крові.

Отриманий комплекс даних дозволить дати достатньо повне уявлення про стан скоротливої функції міокарда, гемодинамічних змін в умовах впливу потенційних кардіотонічних засобів.

Перспективними для подальшого вивчення будуть вважатися речовини, які значно збільшують силу і швидкість скорочень міокарда, поліпшують процеси розслаблення, збільшують індекси скоротливості.

Безсумнівно, треба звертати увагу на системний артеріальний тиск, а також на загальний периферичний опір, який повинен бути розрахований, виходячи з даних системного артеріального тиску і хвилинного об'єму крові (ХОК), про що буде сказано нижче. Важливим є характер ЕКГ (відсутність тахікардії, аритмії, порушень форми, амплітуди зубців, тривалості інтервалів і т.д.).



**Рис. 3. Схема розрахунку параметрів кардіодинаміки і індексів скоротливості міокарда.**

$P_{\max}$  – тиск максимальний (мм рт.ст.);

$P_p$  – тиск, що розвивається у шлуночку (мм рт.ст.);

$P_a$  – тиск абсолютний (мм рт.ст.);

$dp/dt_{\max}$  – максимальна швидкість наростання тиску в шлуночку (мм рт.ст.);

$\frac{dp/dt_{\max}}{P_p}$  – індекс скоротливості Верагута ( $c^{-1}$ ).

Заштрихована площа під кривою тиску –  $\frac{dp/dt_{\max}}{ПТ}$  інтегральне ізометричне напруження ПТ (для розрахунку індексу),  $t$  – швидкість від зубця R до максимуму  $dp/dt$ .



### 3.2. Визначення показників продуктивності серця і загального периферичного опору судин

На сучасному етапі досліджень серцево-судинної системи хвилинний об'єм крові визначають методами електромагнітної і звукової флоуметрії. При відсутності відповідного обладнання можливо визначати ХОК методами тетраполярної реографії, розведення радіоактивних індикаторів або фарбників, термодилуції і т. д.

Враховуючи величини артеріального тиску, ХОК, розраховують загальний периферичний опір судин (ЗПОС) за загальноприйнятими формулами. Безперечно, слід звертати увагу на речовини, які збільшують ХОК і знижують ЗПОС.

У дослідах на ненаркотизованих тваринах припустиме визначення хвилинного об'єму крові за формулою:

$$\text{ХОК} = K \cdot V \cdot (R_a/R_{ca})^2, \text{ де}$$

$K$  - поправочний коефіцієнт, що дорівнює 2,1;

$V$  – об'ємна швидкість кровотоку в сонній артерії – визначається методом електромагнітної флоуметрії;

$R_a$  – радіус аорти у тварин (знаходять за номограмою);

$R_{ca}$  – радіус сонної артерії.

Дози сполук при дослідженнях, вказаних в пп. 3.1 і 3.2, підбирають дослідним шляхом, йдучи від величин  $DL_{50}$  і  $SE_{50}$ , отриманих в дослідах на ізольованих препаратах міокарда. Обов'язкове обґрунтування вибраної дози препарату.

Вивчають вплив потенційних кардіотонічних засобів на скоротливу активність міокарда і показники гемодинаміки як при одноразовому, так і при повторному введенні досліджуваних сполук внутрішньо і парентерально, а також при тривалій внутрішньовенній інфузії.

## 4. Вивчення впливу потенційних кардіотонічних сполук на різні сторони метаболізму міокарда

Реалізація позитивного інотропного ефекту супроводжується мобілізацією численних, узгоджених у часі метаболічних реакцій, які забезпечують як збільшення сили і швидкості скорочень міокарда, так і активацію сполучених біохімічних перетворень. Тому зміни основних показників енергетичного, пластичного і електролітного обміну міокарда під впливом досліджуваних речовин є важливою характеристикою механічної активності серця. Крім того, ці дані можуть бути використані для прогнозування ефективності і безпеки застосування досліджуваних кардіотонічних сполук при різних формах СН, а також для з'ясування їх молекулярних механізмів дії.

### 4.1. Вивчення енергетичного обміну міокарда

Серед метаболічних реакцій центральне місце посідають процеси постачання скорочувального акту енергією. Енергозабезпечення клітин міокарда здійснюється такими послідовними процесами:

1) утворення АТФ у реакціях окислення жирних кислот, глюкози та інших субстратів, пов'язаних із фосфорилуванням АДФ неорганічним фосфатом;

2) стадія транспорту енергії від місця утворення до місць використання;

3) реакції використання енергії для скорочення, підтримки іонних градієнтів на клітинних мембранах, здійснення біосинтетичних процесів.

Вплив досліджуваних сполук на важливіші показники енергетики міокарда, які характеризують кожний з розглянутих вище етапів, вивчають, використовуючи загальноприйнятні біохімічні методи.

При цьому досліджують:

а) вміст АТФ, АДФ, АМФ, КФ, Фн. Ці показники визначають енергетичний потенціал клітини. Аналіз кожного параметру системи аденілових нуклеотидів і загальноприйнятих коефіцієнтів (потенціал фосфорилування і т. д.) дозволяє зробити висновок про вагомий вплив досліджуваних речовин на процеси синтезу або утилізації макроергів;

б) вміст глікогену і жирних кислот у гомогенаті серцевого м'яза. Ці показники свідчать про вплив досліджуваних речовин на інтенсивність використання і утворення основних енергетичних субстратів міокарда;

в) вміст пірувату і лактату у міокарді і крові, а також їх співвідношення. Разом з даними щодо активності лактатдегідрогенази ці дані дозволяють судити про вплив досліджуваних речовин на інтенсивність реакцій аеробного та анаеробного окислення;

г) активність креатинфосфокінази дозволяє судити про інтенсивність переносу енергії від місця утворення до місць використання.

При виконанні робіт, спрямованих на з'ясування провідних метаболічних ланок, через які реалізуються фармакодинамічні ефекти даного кардіотонічного засобу, можуть бути використані додаткові методи дослідження (визначення вмісту субстратів і активності окремих ферментів гліколізу і циклу трикарбонових кислот, вмісту нікотинамідних коферментів, інтенсивності окислювального фосфорилування в мітохондріях і т. д.).

### **4.2. Вивчення електролітного і пластичного обміну міокарда**

Сила і тривалість скорочень серцевого м'яза визначається не тільки ефективністю енергозабезпечення контрактильного апарату, але і рівнем  $\text{Ca}^{2+}$  поза і всередині клітини. Різноманітні механізми, які призводять до підвищення внутрішньоклітинної концентрації вільних іонів  $\text{Ca}^{2+}$ , відіграють важливу роль в реалізації позитивної іотропної дії кардіотонічних засобів.

Визначення важливих параметрів електролітного балансу міокардальної клітини, активності ферментних систем, що забезпечують підтримку іонних градієнтів і формування іонних струмів, а також показників білкового обміну проводять, як правило, лише для з'ясування механізмів кардіотонічної дії досліджуваних засобів. Вибір тих чи інших методів диктується конкретною задачею, що стоїть перед дослідником.

## **5. Дослідження гемодинамічного і метаболічних ефектів кардіотонічних засобів за умов експериментальної серцевої недостатності**

Критеріями оцінки виникнення експериментальної недостатності серця (ЕСН) є зниження сили і швидкості скорочень ізольованих препаратів серця, подовження часу активації їх скорочень, зміни частоти і ритму скорочень (на препаратах, що спонтанно скорочуються); у лабораторних тварин – зниження сили і швидкості скорочень правого і/або лівого шлуночків, погіршення процесів їх розслаблення; поява аритмії різного характеру (в залежності від моделі експериментальної недостатності серця), зміна ЧСС, зменшення індексів скоротливості, зниження показників продуктивності серця, падіння артеріального тиску, збільшення кінцевого діастолічного тиску у шлуночках серця, зниження об'ємної швидкості коронарного кровотоку.

ЕСН повинна бути легко відтворювана на різних видах лабораторних тварин, характеризуватися стабільністю гемодинамічних показників.

Незважаючи на значну кількість відомих способів моделювання НС в експерименті, жоден з них у повному обсязі не відповідає всім зазначеним умовам. Тому на етапі доклінічного вивчення оцінка дії потенційних кардіотонічних сполук повинна бути здійснена на різних (одна – *in vitro*, дві – *in vivo*, в тому числі, одна – на крупних лабораторних тваринах, бажано на тому виді, на якому проводилося вивчення скоротливої функції міокарда і стан гемодинаміки) моделях ЕСН з числа включених в дані методичні рекомендації.

## 5.1. Моделювання недостатності ізольованих препаратів міокарда

Випробування потенційних кардіотонічних сполук на препаратах міокарда з різними формами експериментальної недостатності, позбавлених нейро-гуморальних регуляторних впливів цілісного організму, дозволяє встановити особливості реалізації їх позитивної інотропної дії за умов, коли порушення скоротливої функції залежить тільки від структурних і метаболічних ушкоджень серцевого м'яза.\*

### 5.1.1. Модель «спонтанної недостатності» ізольованих препаратів міокарда

Досліди проводять на ізольованих лівих передсердях, папілярних м'язах мурчаків, щурів або котів, які скорочуються в ізометричному режимі при адекватній частоті стимуляції: для щурів 0,5–1 Гц, для котів, мурчаків – 2–2,5 Гц. Після досягнення стабільного рівня максимального напруження, що розвивається, ( $T_{\max}$ ) і  $+T_{\max}$  частоту стимуляції збільшують у 2 рази. Перфузію препаратів здійснюють оксигенованим розчином Кребса при температурі 35–37°C. Як правило, через 60–90 хв після досягнення нового стаціонарного рівня  $T_{\max}$ , і  $+T_{\max}$  і  $-T_{\max}$ , починають зменшуватися. Критерієм розвитку «спонтанної недостатності» препаратів є зниження  $T_{\max}$  більше ніж на 50%.

### 5.1.2. Модель «гіпоксичної недостатності» ізольованих препаратів міокарда

Зниження параметрів скоротливості на ізольованих препаратах міокарда теплокровних тварин (папілярного м'яза, правому передсерді, смузі шлуночків), досягається використанням для аерації газової суміші з вмістом 5%  $O_2$ , 5%  $CO_2$  і 90%  $N_2$ . Зниження  $T_{\max}$  і  $+T_{\max}$  спостерігається впродовж перших 10 хвилин і досягає, як правило, 30–50% від початкового рівня.

Застосування «аноксичного» розчину (95%  $N_2$  і 5%  $CO_2$ ) дозволяє домогтися зниження  $T_{\max}$  на 85–90%.

### 5.1.3. Відтворення «недостатності» ізольованих препаратів міокарда за допомогою фармакологічних сполук

Додаткова інформація про особливості і механізми реалізації позитивної інотропної дії досліджуваних сполук може бути отримана в умовах пригнічення скоротливості препаратів міокарда барбітуратами, бета-блокаторами і блокаторами повільного спрямованого внутрішньоклітинного струму  $Ca^{2+}$ .

Для зменшення  $F_{\max}$  більш ніж на 30% використовують лікарські препарати в таких концентраціях:

Натрія пентобарбітал (нембутал) –  $1 \cdot 10^{-4}$ – $3 \cdot 10^{-4}$  М

Пропранолол (анаприлін, індерал) –  $1 \cdot 10^{-5}$ – $1 \cdot 10^{-4}$  М

Верапаміл –  $1 \cdot 10^{-6}$ – $1 \cdot 10^{-5}$  М

За умов кожної з вказаних моделей «недостатності» ізольованих препаратів міокарда ефекти досліджуваних і еталонних сполук співвідносять, застосовуючи їх у концентраціях, що відповідають  $SE_{50}$  (див. 2.4).

## 5.2. Моделювання ЕСН

Гостру, підгостру та хронічну недостатність серця у різних видів лабораторних тварин відтворюють шляхом створення експериментальних пороків серця, гіпертензії малого кола кровообігу або зменшення скорочувальної активності міокарда внаслідок його ішемічних пош-

\* Перевагу слід надавати вищезгаданим моделям СН. Можуть бути використані й інші адекватні моделі, які відповідають викладеним (5) умовам.

коджень. Слід підкреслити, що ізольованої в точному розумінні недостатності правого або лівого шлуночка не існує. Тому у кожному конкретному випадку можна казати лише про перевагу порушень функції того чи іншого відділу серця.

### *5.2.1. Модель гострої і підгострої недостатності гемодинамічного типу у щурів (методика Везнак-Когана)\**

Серцево-судинна недостатність гемодинамічного типу моделюється у щурів масою 190-220 г шляхом стенозування діафрагмального сегмента черевної аорти.

У дослідах на щурах можуть бути створені і інші моделі СН\*\*.

Для оцінки ступеня ЕСН використовують електрокардіографічні (збільшення серцевого ритму, збільшення систолічного показника, зміщення електричної осі серця в бік лівограми, минуці патологічні зміни інтервалу ST і зубця T з одночасним збільшенням зубця Q) і гемодинамічні показники (див. п.3.2). Крім того, ступінь ЕСН характеризують на підґрунті даних макроскопічних (абсолютна, відносна маса серця, серцевий коефіцієнт (СК) – (маса серця/маса тварини) · 100, наявність набряку, гідротораксу, асцити) і біохімічних (див. пп.4.1, 4.2) досліджень.

### *5.2.2. Відтворення ЕСН шляхом створення дозованого надклапанного стенозу аорти у кролів*

Дозований стеноз аорти моделюють у кролів, наркотизованих барбамілом (60 мг/кг), шляхом затягування шовкової лігатури на шаблоні діаметром 2,4 мм, що відповідає зменшенню зовнішнього діаметру аорти у 2,5 рази\*\*\*.

Ознаки СН (п.5.2.1) розвиваються, як правило, через 6 тижнів після операції. Дана модель досить адекватно відтворює типові для застійної СН клінічні ознаки і регуляторні порушення, але, на жаль, характеризується високою смертністю тварин.

### *5.2.3. Експериментальний стеноз аорти у собак*

Методи створення коарктації аорти шляхом зменшення діаметру аорти або шляхом введення подразливих розчинів детально описані в монографії А.М. Хилькіна і В.Я. Светлова «Моделирование поражений сердца и сосудов». – М.: Медицина, 1979.- С. 259–267.

### *5.2.4. Моделювання ЕСН шляхом створення мітральних вад*

Методики створення стенозу лівого атріо-вентрикулярного отвору і недостатності мітрального клапана у собак в гострому і хронічному досліді докладно розглянуті в книзі «Моделирование заболеваний»/Под ред. С.В. Андреева.- М., 1973.- С. 223 – 227. Величину стенозу або недостатності дозують за інтенсивністю змін тиску в лівому шлуночку і передсерді.

До розвитку ЕСН призводять стенозування мітрального отвору, яке супроводжується підвищенням тиску в лівому передсерді понад 65 мм рт.ст., а також недостатність мітрального клапана II-III ступеня. При II ступені вади (стулки ушкоджені на 11–15% загальної площі) тиск у лівому передсерді підвищується в середньому на 275%, а Рлп знижується на 19%. Недостатність III ступеня розвивається при пошкодженні клапану на 16–25%. Тиск у правому передсерді підвищується більше ніж у 4 рази, а Рпш знижується в середньому на 23%.

При формуванні вади II ступеня тривалість життя собак 11–30 діб. Більшість тварин з недостатністю клапану III ступеня гине в 1 добу після операції.

\* Див. Коган А.Х./Бюлл. эксперим. биол. – 1961.– Т.45, №1.– С. 112.

\*\* Див. Lecarpentier Y., Martin J.L. Gastineau et al./Am. J. Physiol.– 1982.– V.242, №5.– P. 855–861.

\*\*\* Див. Дугин С.Ф., Городецкая Е.А./Кардиол.– 1984.– Т.24, №7.– С. 102–104.

### 5.2.5. Відтворення гострої лівошлуночнової недостатності у собак шляхом послідовного перев'язування лівої нижньої і лівої обгинаючої коронарної артерії\*

### 5.2.6. Моделювання хронічного легеневого серця (ХЛС)

З метою відтворення хронічного легеневого серця в експерименті на собаках моделюють хронічну пневмонію на основі емболізації судин малого кола.\*\*

Одночасно до патогенетичного процесу залучаються паренхіма легенів, бронхо-легеневий апарат, що супроводжується імунологічною перебудовою організму з участю автоімунного механізму ушкодження легеневої тканини на пізніх етапах формування пневмонії.

При ХЛС відмічаються зниження скоротливої активності міокарда, зменшення інтенсивності діастолічного розслаблення, стійке підвищення тиску в малому колі кровообігу (через 6 міс від моменту відтворення хронічної пневмонії), а також морфологічні ознаки деструктивно-дистрофічного процесу в міокарді.

Враховуючи складність і трудомісткість моделювання, дослідження фармакодинаміки кардіотонічних сполук за умов ЕСН повинно проводитися комплексно. Разом з вивченням гемодинамічних ефектів досліджуваної речовини (див. пп.3.1, 3.2), слід прагнути отримати максимальну інформацію про її вплив на метаболізм серцевого м'яза (див. пп.4.1, 4.2).

Крім того, ізольовані препарати міокарда тварин із серцево-судинною недостатністю можуть бути використані для з'ясування механізмів позитивної дії досліджуваних сполук.

## 6. Вивчення інших видів активності, важливих для виявлення кардіотонічної дії досліджуваних сполук

Необхідними при вивченні потенційних кардіотонічних сполук є дослідження з виявлення їх антиаритмічних властивостей, вивчення впливу на об'ємну швидкість коронарного кровотоку, на показники кислотно-лужної рівноваги, а також обмін води та елекролітів.

При цьому використовують загальноприйняті методи. Зокрема антиаритмічні властивості повинні бути вивчені на одній з моделей ЕСН, вплив на коронарний кровоток – за методом електромагнітної або ультразвукової флоуметрії як на інтактних тваринах, так і на гварнах з ЕСН. Показники кислотно-лужної рівноваги міокарда визначаються за методом мікро-Аструп або за допомогою газоаналізаторів. При цьому досліджується кров, яка надходить до серця і відтікає від нього.

---

\* Див. Jentzer J.H., Le Jemtel T.H. et al.//Am. J. Cardiol.- 1981. - V.48, №1.– P. 75–83.

\*\* Модель розроблена в НДЦ Національного медичного університету під керівництвом професора С.Б.Французової (А.С. №826401 від 04.01.81 і А.С. №875443 від 22.06.81). У зв'язку з гравалістю періоду створення моделі ХНЗЛ для вивчення кардіотонічних сполук вона застосовується лише на заключному етапі доклінічних досліджень або при цілеспрямованому вивченні засобів, призначених для лікування правошлуночнової недостатності.

## **ДОДАТКИ**

### **Додаток 1**

**Програма вивчення хімічних сполук з метою виявлення речовин з кардіотонічною дією**

**А. Скринінг і первинна оцінка**

1. Виявлення речовин, які мають позитивну інотропну дію на препарати серцевого м'язу теплокровних тварин.

Ефективними вважаються сполуки, які збільшують максимальне напруження, що розвивається ( $T_{\text{макс}}$ ), максимальну швидкість скорочень ( $+T'_{\text{макс}}$ ) та/або максимальну швидкість розслаблення ( $-T'_{\text{макс}}$ ) більше ніж на 20%.

2. Визначення  $SE_{50}$  для  $T_{\text{макс}}$ ,  $+T'_{\text{макс}}$  та інших показників.

3. Визначення вибірковості інотропної дії потенційних кардіотонічних сполук.

Перспективними вважаються речовини, коефіцієнт селективності яких менший ніж 1.

4. Визначення орієнтовної токсичності досліджуваних речовин експрес-методами в дослідах на мишах. Обчислення  $DL_{50}$ .

Для вивчення на подальших етапах відбираються сполуки, які мають  $SE_{50}$  менше або більше, ніж «еталонні» кардіотоніки.

**Б. Вивчення впливу потенційних кардіотонічних сполук на скоротливу функцію міокарда і параметри гемодинаміки в дослідах in vivo:**

- а) визначення сили скорочень шлуночків серця;
- б) визначення швидкості скорочень міокарда;
- в) визначення показників розслаблення серцевого м'язу;
- г) обчислення індексів скоротливості;
- д) визначення ХОК;
- е) визначення системного артеріального тиску;
- ж) визначення характеру ЕКГ;
- з) обчислення загального периферичного опору судин.

Перспективним для подальшого вивчення є сполуки, які суттєво збільшують тиск в порожнині серця, максимальну швидкість наростання тиску в шлуночку, індекси скоротливості, які підвищують показники продуктивності серця, не змінюють (або незначно знижують) артеріальний тиск, не викликають різкого хронотропного ефекту, знижують загальний периферичний опір судин.

Отримані дані дозволяють з високим ступенем імовірності виявити речовини, які мають кардіотонічну дію і відібрати найбільш перспективні з них для подальшого доклінічного вивчення відповідно з вимогами Державного фармакологічного центру МОЗ України, а саме:

- визначення показників токсичності на двох видах (в тому числі великих) лабораторних тварин за методом Літчфілда-Уїлкоксона;
- вивчення впливу на енергетичні і пластичні процеси в міокарді;
- вивчення впливу на коронарний кровотік і киснепостачання міокарда;
- вивчення антиаритмічної активності;
- вивчення загальнофармакологічних властивостей (вплив на дихальну, травну, нервову системи та систему крові).

### **Додаток 2**

**Програма експериментального вивчення речовин, запропонованих для клінічних досліджень як кардіотонічні засоби (в обсязі, необхідному для подання матеріалів до Державного фармакологічного центру МОЗ України).**

Для отримання дозволу на проведення клінічних досліджень нової кардіотонічної речовини у Державний фармакологічний центр МОЗ України (ДФЦ) в обов'язковому порядку повинні бути представлені наступні матеріали:

- дані про специфічну (кардіотонічну) активність препарату;

- відомості про нешкідливість (включаючи дані про тератогенні, ембріотоксичні і мутагенні властивості);
- дані, які підтверджують переваги запропонованого препарату над відомими кардіотоніками;
- особливості впливу досліджуваної речовини на різні органи і системи;
- основні параметри фармакокінетики;
- необхідна нормативно-технічна документація на субстанцію і лікарські форми, а також їх зразки.

Вивчення специфічної (кардіотонічної) активності запропонованої речовини передбачає:

а) дослідження впливу на скоротливу активність міокарда і параметри гемодинаміки у інтактних тварин:  $P_{\max}$ , КДД,  $dp/dt_{\max}$ , індекс Верагута, хвилинний об'єм крові, ударний об'єм крові, загальний периферичний опір, системний артеріальний тиск, центральний венозний тиск (див. пп.3.1, 3.2);

б) виявлення особливостей позитивного інотропного ефекту в дослідях на ізольованих препаратах серцевого м'язу теплокровних (визначення  $SE_{50}$  для параметрів ізометричного скорочення ізольованих смужок міокарда при адекватній і обмеженій оксигенації, а також при різних частотах стимуляції – див. пп.2.1–2.4);

в) вивчення впливу потенційних кардіотонічних сполук на найважливіші показники метаболізму міокарда. Слід визначити вплив досліджуваної речовини на вміст АТФ, АДФ, АМФ, КФ, Фн, глікогену, жирних кислот, пірувату, лактату (п.4.1). Отримані дані використовують для прогнозування ефективності і безпеки застосування досліджуваної речовини, а також для припущення про можливі механізми дії;

д) вивчення гемодинамічних і метаболічних ефектів кардіотонічних сполук за умов експериментальної серцевої недостатності (ЕСН). Гемодинамічні і метаболічні ефекти запропонованої речовини вивчають не менш ніж на 3-х моделях ЕНС (одна – *in vitro*, дві – *in vivo*, в тому числі одна – на великих лабораторних тваринах, наведених у пп.5.1, 5.2).

Результати вивчення специфічної активності повинні бути проведені порівняно з еталонними кардіотонічними засобами. Препаратом порівняння для нових кардіостероїдів є дігосин, для нестероїдних кардіотоніків – ізадрин, дофамін, мілрипон, сулмазол та ін. (залежно від хімічного класу та призначення досліджуваної сполуки).

Дані про специфічну активність досліджуваного кардіотоніка доповнюються відомостями про інші види активності, важливі для виявлення його кардіотонічної дії:

- а) антиаритмічні властивості;
- б) вплив на обмін води і електролітів;
- с) показники кислотно-лужної рівноваги;
- д) вплив на гемостаз, реологічні властивості крові, систему фібринолізу.

Ці дослідження проводять згідно із загальноприйнятими методиками, передбаченими ДФЦ.

Вивчення нешкідливості, основних параметрів фармакокінетики, а також впливу речовин, рекомендованих для клінічних досліджень, на функції центральної нервової системи, шлунково-кишкового тракту, органів дихання, систему крові і т.д. здійснюють згідно з вимогами ДФЦ.

Нормативно-технічна документація на субстанцію і запропоновані лікарські форми також оформлюють згідно з останніми.

## **ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНЕ ВИВЧЕННЯ АНТИАНГІНАЛЬНИХ, ПРОТИШЕМІЧНИХ, КАРДІОПРОТЕКТОРНИХ ЗАСОБІВ**

Горчакова Н.О.,  
Чекман І.С.,  
Соловійов А.І.,  
Французова С.Б.,  
Мохорт М.А.,  
Зупанець І.А.,  
Гриневич О.Й.,  
Ніженковська І.В.,  
Кава Т.В.,  
Серединська Н.М.

### **Загальні положення**

Ішемічна хвороба серця (ІХС) – одна з найпоширеніших хвороб. Вона може бути характеризована як патологічний процес у міокарді, в основі якого лежать порушення коронарного кровообігу атеросклеротичної або функціональної природи, які створюють умови для появи невідповідності між постачанням і потребою серця в кисні. Найбільш частою причиною ІХС є стеноз однієї з коронарних артерій або спазм її ділянки. Вирішення задачі спрямованої фармакологічної дії на згадані процеси утруднюється тим, що стеноз коронарної артерії – явище незворотне, а питання етіології і патогенезу порушення реактивності коронарних артерій (схильність до спазму) до цієї пори є предметом багатьох дискусій. Тому основні заходи при лікуванні ІХС спрямовані на усунення її проявів, в основі яких лежить невідповідність між постачанням і потребою серця в кисні. Найбільш ефективними підходами при цьому є поліпшення кровозабезпечення зони ішемії міокарда та зменшення потреби серця в кисні. Зараз у клініці є значна кількість препаратів, які впливають на ці фактори.

Неадекватне забезпечення киснем певних ділянок міокарда не завжди супроводжується нападами стенокардії, а може проявлятися як безболісні епізоди ішемії. Тому для лікування хворих ІХС необхідні як препарати антиангінальної дії, так і препарати протиішемічної дії. Дослідження останніх років показали, що ішемія і реперфузія (відновлення току крові) викликають «каскад» метаболічних реакцій з ушкодженням міокарда. Тому, разом з традиційними антиангінальними засобами значну увагу приділяють міокардіальній цитопротекції (кардіопротекції), тобто захисту клітини серця від ішемії-реперфузії.

Серед протиішемічних (антиангінальних) засобів головними залишаються нітрати, бета-адреноблокатори, антагоністи кальцію. В терапії ІХС важливу роль відіграють активатори К-АТФ-чутливих каналів, антигіпоксанти, антиоксиданти, інгібітори ангіотензинперетворюючого ферменту, антагоністи рецепторів ангіотензину II, статини, антагоністи ендотеліну, препарати, що впливають на рівновагу простагліциклін-тромбоксану, специфічні антибрадикінінові засоби та ін.

Основною групою препаратів для лікування ішемічної хвороби є лікарські засоби, які класифікують таким чином.



I. Препарати, які знижують потребу міокарда в кисні і підвищують його доставку

1. Нітрогліцерин, препарати нітрогліцерину пролонгованої дії – сустанг, нітронг, триніт-ролонг, нітро-мак, нітродерм і нітрати тривалої дії – нітросорбіт (іzosорбїду динітрат, ізокет), мононіт, омкард (іzosорбїду-5-мононітрат) і т.ін.

2. Коронароактивні препарати різного механізму дії – молсидомін, аміодарон та ін.

3. Антагоністи кальцію – верапаміл (ізоптин, фіноптин), фенігідин (піфедипін, адалат, коринфар), пікорандил, амлодипін, дилтіазем, сензит, форидон, мібсфрадил та ін.

II. Препарати, що знижують потребу міокарда в кисні

Бета-адреноблокатори – анаприлін (пропранолол), корданум (галінолол), атенолол, ацебутолол (сектраль), надолол, метопролол, бісопролол, буциндолол, небіволол та ін.

III. Препарати, що збільшують доставку кисню до міокарду

1. Інгібітори аденозиндезамінази – дипіридамом (курантил).

2. Інгібітори фосфодіестерази циклічних нуклеотидів – суфілін, амінофілін, пентоксифілін (трентал, аганурин), папаверину гідрохлорид, но-шпа, карбокромел (інтенкордин) та ін.

IV. Антиагреганти – кислота ацетилсаліцилова, пентоксифілін, дипіридамом, клопїдогрел, аспірин та ін.

V. Препарати, що підвищують резистентність міокарда до гіпоксії

1. Енергозабезпечуючі препарати – АТФ, АТФ-лонг, фосфокреатин (неотон), мілдронат, кислота глутамінова, аспаркам та ін.

2. Електроактиватори – цитохром С, кислота аскорбінова, рибофлавін, убїхінон, енергостим та ін.

3. Антиоксиданти – токоферолу ацетат, лібунол, есенціале, ліпін, кратал, ербісол, спіруліна та ін.

4. Антигіпоксанти специфічної та неспецифічної дії.

5. Анаболічні препарати: стероїдні – ретаболіл, неробол, нестероїдні – калію оротат, рибоксин та ін.

6. Цитопротектори – триметазидин.

VI. Інші препарати, які використовуються для лікування стенокардії

1. Антигіреодні препарати – мерказоліл.

2. Антибрадикаїнові препарати – пармідин, алінідин.

3. Препарати рефлексорної дії – валідол.

4. Статини – ловастатин, симвастатин та ін.

5. Інгібітори АПФ – каптоприл, еналаприл.

6. Блокатори рецепторів ангіотензину II – лосартан.

7. Антагоніст ендотеліну – бозентан.

Поєднання антиангінальної і антигіпоксичної дії свідчить про гарні перспективи застосування препарату як кардіопротекторного агента.

Аналіз клінічних і експериментальних даних дозволяє визначити вимоги до нового антиангінального препарату для тривалого лікування ішемічної хвороби серця. Він повинен мати як мінімум одну з таких властивостей:

- 1) зменшувати вживання серцем кисню;
- 2) збільшувати швидкість коронарного кровообігу;
- 3) не знижувати скоротливу активність міокарда і не викликати тахікардію.
- 4) знижувати переднавантаження або післянавантаження на серце (або вмикати обидва механізми) без вираженої тахікардії та гіпотензії;
- 5) мати антиадренергічний вплив;
- 6) перерозподіляти кров у бік ішемізованої ділянки (не викликати синдром «обкрадання» і стимулювати розвиток коронарних колатералей).

Він також повинен:

- не зменшувати розумову та фізичну активність, не викликати безсоння та зниження апетиту;

-- поєднуватися з іншими препаратами;

-- не викликати звикання та синдрому відміни після припинення вживання препарату.

При гострій ішемії міокарда спостерігаються напади стенокардії, під час яких відбувається зсув метаболізму в кардіоміоцитах у бік анаеробіозу, активується симпатична нервова система та вивільнюється норадреналін.

До препаратів, що купірують гострий наступ стенокардії, висувають такі вимоги:

1. Наявність кардіотропної (негативної інотропної) активності.
2. Здатність знижувати тонус коронарних артерій та, відповідно, збільшувати коронарний кровотік.
3. Відсутність тахіфілаксії.
4. Зниження перед- і післянавантаження на міокард, покращання кровозабезпечення міокарда, тканин печінки, нирок.
5. Відсутність супутніх порушень кровозабезпечення життєво важливих органів.

Аналіз літературних даних та експериментальні дослідження дозволили констатувати, що головними критеріями, які дозволяють визначити речовину як антиангінальну, є наявність негативного інотропічного ефекту, зменшення об'єму кисню, що вживає міокард, та збільшення об'ємної швидкості коронарного кровообігу.

1. Програма дослідження антиангінальних властивостей нових біологічно активних сполук  
На основі можливості реалізації первинного фармакологічного ефекту оцінка препаратів повинна бути проведена в два етапи.

### 1 ЕТАП

Первинний відбір (скринінг)

Головним завданням цього етапу є виявлення негативних інотропічних властивостей досліджуваних сполук та оцінка їх впливу на кардіо- та гемодинаміку за допомогою методів реєстрації показників скоротливості міокарда та судинного тону.

### 2 ЕТАП

Оцінка антиангінальних препаратів, вивчення протиішемічних властивостей препаратів на моделях хронічної та гострої ішемії міокарда.

### 3 ЕТАП

Поглиблене вивчення механізмів антиангінального та антиішемічного ефектів речовини на моделях в досліджах *in vitro* та *in vivo* та встановлення можливостей механізмів специфічного ефекта.

## **1. Скринінг потенціальних антиангінальних засобів**

### ***1.1. Вплив на скоротливу активність ізольованих препаратів міокарда та коронарних артерій теплокровних***

В досліджах можуть бути використані ізольовані папілярні м'язи правого шлуночка мурчака та обох шлуночків серця кролів, кішок та щурів. У тварин під наркозом (уретан, хлоралоза) вилучають серце, фіксують в ванночці з охолодженням до 20°C поживним розчином, що асрується, виділяють папілярні м'язи діаметром по можливості не більше 1 мм та фіксують їх у перфузійній камері; використовуючи для препаратів сердець щурів розчин Кребса, мурчаків -- розчин Тірде.

Препарати стимулюють прямокутними імпульсами довжиною 3–5 мс та амплітудою, що на 10–12% перевищує порогову. Частота стимуляції визначається типом смужки міокарда, видом тварин та індивідуальними властивостями досліджуваного препарату та може змінюватись в межах 0,2–4Гц. Оцінку впливу досліджуваної сполуки на ізольовані препарати сер-

цевого м'яза, який скорочується в ізометричному режимі, проводять за такими параметрами:

- F макс – максимальна сила, що розвивається,
- $dF/dt+$  – швидкість скорочення, що розвивається,
- $dF/dt-$  – швидкість розслаблення, що розвивається,
- ЧДМ – час досягнення максимальної сили скорочення,
- ЧР – час розслаблення

Скоротлива активність смужок міокарда або папілярних м'язів реєструється або в ізометричному, або в ізотонічному режимах. Вибір режиму скорочення визначається виходячи з завдання дослідження.

При вивченні кардіотропної (негативної інотропної) активності визначають  $OD_{50}$  – дозу при якій величина негативного інотропного ефекту 50% від максимальної.

Реєстрація активності скорочення спіральних смужок або кілець ізольованих коронарних артерій свиней або собак виконується, як правило, в ізометричному режимі (за виключенням тих випадків, коли необхідно зареєструвати зміни довжини м'яза в ізотонічних умовах при постійній, заздалегідь заданій силі). Детально досліди з гладенькими м'язами та методи інтерпретації отриманих результатів описані в книзі Р.Блатнера «Експерименти на ізольованих препаратах гладеньких м'язів» (М.: Мир, 1983).

Прикладом є протокол досліду з вивчення препарату, з потенційними властивостями антагоніста кальцію. Ізольований препарат гладенького м'яза, який інгібується в безкальцієвому буферному розчині, і на який впливає гіперкальцієвий розчин (60 мМ КСІ). Потім в розчин додають 20 мкг/мл  $CaCl_2$  та записують скорочення препаратів до фази плато. Якщо досліджувана субстанція зменшує величину ізометричної напруги, яку розвиває гладенький м'яз, на 50%, то можна вважати, що ця речовина має  $Ca^{2+}$ -антагоністичну властивість.

Для порівняння вкажемо, що ніфедипін проявляє такий ефект у концентрації 0,001 мкг/мл, верапаміл – 0,01 мкг/мл, цинаризин – 1 мкг/мл, дилтіазем – 0,01 мкг/мл.

Окремо треба зупинитись на вивченні можливого впливу досліджуваних препаратів на ендотелій-залежні судинні реакції коронарних артерій. Відомо, що ще у 1867 р. T.L.Brunton вперше застосував амлінітрил для лікування грудної жаби. Але клітинні механізми дії нітратів лишалися незрозумілими до 1970 р., коли було встановлено, що їх ефект обумовлений активацією розчинної гуанілатциклази та зростанням концентрації цГМФ у мітоплазмі гладеньких клітин. У 1980 р. Furchgott та Zawadzki встановили, що розслаблення гладеньких судинних м'язів під впливом ацетилхоліну є ендотелій-залежним і визначається звільненням ендотеліоцитами розчинної, легко дифундуєної субстанції, яка була названа ними ендотеліальним фактором розслаблення (ЕФР); а у 1987 р. Palmer, Ferrige та Moncada ідентифікували ЕФР як оксид азоту (NO).

Хоча механізми дії нітровоазодилаторів, органічних нітратів та сиднонімінів помітно відрізняються, але загальний принцип їх вазоактивного ефекту заснований на звільненні NO з їх молекули.

Спроба знайти нові вазоактивні препарати, які впливають на синтез та/або звільнення NO ендотеліоцитами, є однією з пайактуальніших задач сучасної фармакології серцево-судинної системи.

Для вивчення ендотелій-залежних судинних реакцій виділення ізольованих кілець або спіральних смужок коронарних артерій експериментальних тварин (кролі, собаки, свині) здійснюється з максимальною сумлінністю, аби уникнути механічних ушкоджень ендотеліального виступу судини. Потім попередньо активовані норадреналіном або простагландином F2a судинні препарати піддають впливові одного з відомих ендотелій-залежних вазодилаторів (ацетилхолін, АТР, кальцієвий іонофор A23187 та ін.). Амплітуда ендотелій-залежного розслаблення у інтактних препаратів має становити не менше 40–60% від значення амплітуди скорочення, викликаного норадреналіном або простагландином F2a. Після механічного або

хімічного (сапонін, колагеназа) видалення ендотелію розслаблення у відповідь на ендотелій-залежні дилататори не відновлюється, і часто реєструється скорочення, яке є результатом прямого впливу препарату на гладенькі м'язи судин.

Об'єктом досліджень є сегменти верхньої частини обгинаючої та низхідної епікардіальних коронарних артерій, виділених із серця дорослих статевозрілих свиней. Реєстрація скоротливої активності м'язових сегментів здійснюється в ізометричному режимі. Перфузію препаратів проводять термостатованим (36–37°C) стандартним розчином Кребса. Оскільки судинним препаратом у вихідному стані притаманний слабо виражений базальний тонус, дослідження дилаторних реакцій проводять на тлі попереднього скорочення гладеньком'язових клітин хлористим калієм у концентрації 60 ммоль. Даний рівень тонузу приймають за вихідний, і всі судинні реакції вимірюють щодо цього рівня. Досліджувані речовини – оксид азоту, блокатор NO-синтази (NOS) N-нітро-L-аргінін (NNA), нітрогліцерин (НГ), нітропрурид натрію (НП) та SIN-1 (Sigma) додаються у субмаксимальній фізіологічній концентрації 10 ммоль/л безпосередньо у робочу камеру об'ємом 0,5 мл, що дозволяє здійснювати зміну розчинів у камері протягом 2–3 с. Обрана концентрація NO відповідає його фізіологічному рівню (8 мкмоль/л). Базовий розчин NO (2 ммоль) готують додаванням до 20 мл заздалегідь підготовленої (пропускання протягом 2 год газоподібного аргону) бідистильованої води 5 мл газоподібного NO. Зниження ступеня оксигенації буферного розчину здійснюється пропусканням через нього газоподібного азоту. При цьому тиск кисню ( $pO_2$ ) знижується протягом 3 хв зі 147 до 5–7 мм рт.ст.

Гіпоксія призводить до розвитку повільного скорочення гладеньких м'язів (ГМ) коронарних судин. Амплітуда його на 20-й хвилині гіпоксичного впливу досягає  $37,1 \pm 3,9\%$ . Додавання до нормального буферного розчину NNA (10 ммоль/л) призводить до розвитку ідентичної констрикції судинних ГМ. Амплітуда цієї реакції на 20-й хвилині впливу становить  $33,13 \pm 3,26\%$  вихідного тонузу, що вірогідно не відрізняється від амплітуди констрикторної реакції ГМ на гіпоксію, схожою була і динаміка розвитку. Додавання NNA до буферного розчину з низьким  $pO_2$  не призводить до можливих змін судинного тонузу аж до 20 хв дії. Попередня блокада NOS різко змінює реакцію коронарних артерій на гіпоксію: скорочення не тільки повністю відсутнє, але також спостерігається розслаблення ГМ, що повільно розвивається. Сегменти судин з видаленим ендотелієм або не відповідають на гіпоксію, або реагують незначним скороченням. Аутентичний монооксид азоту та його донори (НГ, НП, SIN-1) у концентрації 10 ммоль/л спричиняють розслаблення кільцевих сегментів коронарних артерій свині як у нормі, так і за умов гіпоксії. Зниження ступеня оксигенації буферного розчину призводить до вірогідного збільшення дилаторних реакцій порівняно з нормою для: NO – на  $44,0 \pm 9,4\%$ , НГ – на  $114,5 \pm 3,0\%$ , SIN-1 – на  $82,3 \pm 5,9\%$ , НП – на  $43,0 \pm 6,6\%$ . Попереднє додавання до буферного розчину NNA призводило до аналогічного вірогідного зростання амплітуди розслаблення ГМ на вплив NO та його донаторів порівняно з нормою на: NO –  $51,9 \pm 7,9\%$ , НГ –  $105,6 \pm 2,9\%$ , SIN-1 –  $88,5 \pm 5,7\%$ , НП –  $49,9 \pm 5,2\%$ . Отримані дані свідчать про те, що ендотелій коронарних артерій свині чутливий до змін ступеня оксигенації доквілля і бере участь у формуванні скоротливої реакції судинної стінки на гіпоксію. Оскільки реакції на гіпоксію та на додавання у розчин NNA схожі за величиною та динамікою розвитку, то можна припустити, що в їх основі лежить один і той самий процес – блокада NOS. Підтвердженням цього є той факт, що на тлі гіпоксії введення NNA не спричиняє констрикції сегментів коронарних артерій свині.

Аналогічна схема експерименту може бути використана і для пошуку нових вазоактивних препаратів з ендотелій-залежним механізмом дії. Можливо, що сам по собі, той чи інший засіб може і не викликати ендотелій-залежне розслаблення гладеньких м'язів судин, бо якщо додати до відомого ендотелій-залежного вазодилатора, може потенціювати його ефект. Треба мати на увазі, що відсутність ендотелій-залежного дилаторного ефекту у препараті в дослідах на гладеньких м'язах судин здорової тварини ще не є свідченням безперспективності його-

го застосування як ендотелій-залежного судинного агента. Можливо, що такий ефект буде знайдено при застосуванні судин, отриманих від тварин з тією або іншою судинною патологією (експериментальний інфаркт міокарда), тварин з непередбачуваною (генетично детермінованою або викликаною) гіпертензією та ін.

### **1.2. Методи оцінки впливу антиангінальних засобів на кардіо- та гемодинаміку**

Для того щоб оцінити вплив препаратів на скоротливу активність міокарда щурів, кішок, собак вивчають динаміку тиску в порожнині серця (P) у часі. Інотропний ефект препарату можна оцінити, розрахувавши величину  $+dP/dt_{\max}$  (максимальна швидкість наростання тиску в шлунку) а потім, розділивши її на величину тиску, що розвивається (Pp), можна отримати незалежний від пред- та постваантаження індекс скорочення (індекс Верагута) ( $s^{-1}$ ). Важливо вивчити вплив речовин і на процес розслаблення, тобто визначити  $-dP/dt_{\max}$  (максимальна швидкість зниження тиску в шлунку) та індекс розслаблення:

$$\frac{dp/dt_{\max}}{Pp}$$

Доцільним є оцінити вплив речовин на функцію кожного шлунка окремо і на тиск в легеневій артерії, а також легенево-артеріальний та загальний легеневий опір (ЛАО і ЗЛО, відповідно).

Дійсними критеріями оцінки є також ХОК (визначення за методом термодилуції або тетраполярної імпульсної реоплетизмографії) та інші показники гемодинаміки (УОК, РІЛШ, РУЛШ, СІ, СпІ, Д, ЗПО). Передусім треба звернути увагу на величину САТ, ХОК, ЧСС.

### **1.3. Додаткові методи скринінгу**

Реєструючи у кішок відтік крові з коронарного синуса та одночасно визначаючи зміст в ньому оксигемоглобіну, можна виділити препарат, який зменшує використання серцем кисню. Важливо, щоб препарат збільшував вміст оксигемоглобіну або  $pO_2$  у венозній крові коронарного синуса. Якщо при цьому об'ємна швидкість коронарного кровообігу не збільшується, а навіть зменшується, препарат можна вважати перспективним. У випадку, коли препарат одночасно збільшує і утримання оксигемоглобіну в крові коронарного синуса, і коронарний кровообіг, необхідно порівняти ступінь збільшення поглинання серцем кисню з об'ємною швидкістю коронарного кровообігу.

Принцип вимірювання кількості крові, що відтікає від коронарного синуса кішки, такий. У гострому експерименті у наркотизованих кішок при штучному диханні розсікають грудну клітку у 5–6 лівому міжребер'ї. Далі видаляють ділянки 5–6 ребер довжиною 1,5–2 см та розсікають перикард. На праве вушко накладається кисетний шов. У центрі ділянки серцевого вушка, обмеженої швом, роблять розріз, через який вводять поліетиленовий катетер, заповнений розчином гепарину. Кисетний шов стягують, після чого катетер проводять з вушка у початок коронарного синуса і вводять тварині гепарин (1000 – 15000 ОД/кг). Катетер поєднують з датчиком електромагнітного витратоміра, що дозволяє зареєструвати об'ємну швидкість кровообігу.

Для реєстрації фазного коронарного кровообігу у собак сонну артерію поєднують з обгинаючою або передньою низхідною гілкою лівої коронарної артерії через проточний датчик електромагнітного витратоміра крові. Бажаною є синхронна реєстрація внутрішньосудинного тиску. Перспективною також вважають речовину, що збільшує вміст оксигемоглобіну (напруги кисню) у крові коронарного синуса. При цьому об'ємна швидкість кровообігу підвищується або зменшується. Важливо, щоб при підвищенні коронарного кровообігу поглинання серцем кисню зменшувалося або не змінювалося. Воно може підвищуватися, але в значно меншому

ступені, ніж при цьому підвищується коронарний кровообіг. При зменшенні коронарного кровообігу під впливом досліджуваної речовини поглинання серцем кисню повинно зменшуватися в більшому ступені ніж коронарний кровообіг.

## **2. Вивчення протиішемічного впливу антиангінальних засобів на моделях гострої і хронічної ішемії міокарда**

### **2.1. Модель гострої ішемії міокарда, яку викликають тимчасовою оклюзією передньої низхідної гілки лівої коронарної артерії протягом 5–20 хв з поступовою реперфузією у досліджах на кішках та собаках**

Висновок щодо протиішемічної дії фармакологічної речовини роблять за зниженням середньої величини підйому сегмента ST на множинні відведення епікардіальної електрограми. Засіб з можливою протиішемічною (антиангінальною) дією буде знижувати середню величину підйому сегмента ST на електрограмі. Оцінку протиішемічної дії можна проводити шляхом ресстрації регіональної скоротливої функції міокарда під час оклюзії та реперфузії коронарної артерії за допомогою тензіорезисторів або ультразвукових кристалів. Речовина з протиішемічною дією зменшує скоротливість, що її викликає ішемія, та/або поліпшує її відновлення під час реперфузії. У цих експериментах також вивчають вплив речовин на підвищення вмісту калію і лактату в крові коронарного синуса, що викликають ішемію.

### **2.2. Модель Angina pectoris (L.Szeheres et al., 1976; модифікація Н.В.Кавєріної та ін., 1980)**

У собак за умов загальної анестезії при штучному диханні розсікають грудну клітку у 4 міжребер'ї зліва. Спеціальним затиском зменшують просвіт лівої низхідної коронарної артерії, одночасно серцю надають штучний ритм, який на 70–80 уд./хв перевищує вихідний, надання штучного ритму здійснюють шляхом електричної стимуляції правого вухка серця за допомогою платинових електродів. При стимуляції протягом 3–5 хв у міокарді створюється ділянка ішемії, яка ресструється у кількох епікардіальних відведеннях електрокардіограми. Експеримент проводять так, що ні зменшення просвіту лівої низхідної коронарної артерії, ні нав'язування штучного ритму само по собі не викликають ішемічних змін у міокарді. Лише обидва фактори разом призводять до підйому сегмента ST в епікардіальних відгалуженнях електрокардіограми. Існує чітка кореляція між величиною підйому сегмента ST на епікардіальній електрокардіограмі та ступенем зменшення внутрішньокордіального рО<sub>2</sub>, виснаженням макроергічних фосфатів, а також зниженням активності креатинфосфокінази у міокарді.

### **2.3. Модель більш тяжкої ішемії**

Відтворюють ішемію на наркотизованих собаках, у яких одночасно зі стенозом передньої низхідної гілки лівої коронарної артерії відтворюють оклюзію обгинаючої гілки лівої коронарної артерії, а при нав'язуванні високого ритму скорочення серця ресструють епікардіальну електрокардіограму та/або регіональну скоротливу функцію міокарда в басейні, що забезпечується передньою гілкою лівої коронарної артерії.

### **2.4. Модифікація моделі гострої ішемії міокарда**

На пенаркотизованих собаках або свинях зі стенозом коронарної артерії ішемію викликають за допомогою бігу на тредбані. Про протиішемічну дію речовини судять за зниженням підйому сегмента ST на ЕКГ та попередженням пригнічення регіональної скоротливої функції.

## **2.5. Модель ішемії на підставі закислення середовища у тканинах**

У дослідях на собаках відтворюють стеноз передньої низхідної гілки лівої коронарної артерії. При зменшенні коронарного кровообігу в вінцевій артерії на 50–70%, що контролюють за допомогою електромагнітного або ультразвукового вимірювання току крові, рН у ділянці ішемії зменшується з 7,5 до 6,8–6,9. Речовину, що вивчають, вводять через 30 хв після відтворення стенозу. Про протиішемічну дію судять за закисленням середовища.

## **2.6. Модель тривалої оклюзії**

На наркотизованих котах або собаках відтворюють тривалу (20–40 хв) оклюзію передньої низхідної гілки лівої коронарної артерії з наступною реперфузією. Протиішемічну дію визначають на підставі підтримки показників гемодинаміки та діяльності серця порівняно з контрольною серією дослідів. Наприкінці періоду реперфузії досліджують вплив речовин на виснаження макроергічних фосфатів у вогнищі ішемії.

## **2.7. Модель тривалої ішемії з визначенням коефіцієнту лінійної регресії**

Після 60-хвилинної оклюзії передньої низхідної гілки лівої коронарної артерії через певні інтервали часу беруть проби крові з вінцевого синуса або з вени, безпосередньо дреноуючої вогнище ішемії. У крові найчастіше за ензиматичним методом визначають лактат і піруват, визначаючи їх співвідношення. Про протиішемічну дію судять за швидкістю наростання цього співвідношення, що визначається методом регресійного аналізу. Речовина, що захищає міокард від ішемічного ушкодження, буде зменшувати коефіцієнт лінійної регресії порівняно з контрольною групою тварин.

## **2.8. Модель коронароспазма (щури, коти, собаки)**

Можливе введення препаратів, що викликають спазм коронарних артерій (метахолін, дигідросерготамін), ендотелін (шлях залежить від речовини)). За цих умов на ЕКГ у стандартних відведеннях або епікардіальній електрограмі (коти) визначається значний підйом сегменту ST. Речовина, що має протиішемічну дію, буде зменшувати або попереджати зміни ЕКГ.

## **2.9. Пітуїтриновий (вазопресиновий) коронароспазм**

Відтворюється в експериментах на котах, кролях (0,5–1 ОД вазопресину або 1–2 ОД пітуїтрину внутрішньовенно) з рестрацією швидкості коронарного кровотоку. Можливе також відтворення в експериментах на щурах (1 ОД внутрішньоочеревинно) під контролем електрокардіограми. Коронароспазм розвивається через 1–1,5 хв та продовжується 15–20 хвилин.

## **2.10. Модель коронарного мікротромбозу**

Наркотизованим котам через катетер, введений у вушко лівого передсердя, інфузією постійно вводять АДФ. Тромбоз викликає значний підйом сегмента ST. Засіб, що має протиішемічну дію, зменшує або попереджає зміни ЕКГ.

## **2.11. Модель експериментального кардіосклерозу**

У дослідях на щурах для емболізації коронарних судин застосовують пластикові 15 мкм мікросфери, що вводять у порожнину лівого шлуночка під час оклюзії висхідної аорти. За контр-

роль слугують псевдооперовані щури. Застосовують також мікросфери, мічені ізотопами, про негативний інотропний ефект судять за змінами сегмента ST. Оцінюють вплив на об'ємну швидкість кровообігу, ультразвукову та електромагнітну флоуметрію, крапельні вимірювачі лі венозного відтоку.

### ***2.12. Ушкодження серця, викликане частковою подовженою коронарною оклюзією (Т.В. Морозова, 1986)***

В експериментах на кролях здійснюють часткову, дозовану, що збільшується у міру компенсації ішемії, тимчасову оклюзію низхідної гілки обгинаючої коронарної артерії, використовуючи варіант оклюдера з гвинтом. На ЕКГ встановлені ознаки ішемії міокарда – гігантський зубець Т, зсув сегмента ST нижче ізолінії. Для підтримання ішемії міокарда на пороговому рівні знов і знов повільно збільшують ступінь звуження коронарної артерії, зберігаючи ознаки слабкої ішемії міокарда, але не допускаючи появи підйому сегмента ST – ознаки сильної ішемії.

### ***2.13. Кальцієві (ізадринові) некрози міокарда***

Кальцієві некрози міокарда викликають у щурів породи Вістар масою 150–200 г підшкірним введенням ізопротеренолу у дозі 30 мг/кг. Тварин декапітують через 1–6 год після ін'єкції, обробляють та досліджують папілярні м'язи лівих або правих шлуночків серця.

Ізадринове ушкодження міокарда щурів викликають також підшкірним введенням ізадрину в дозі 100 мг/кг з інтервалом 24 години, а також внутрішньом'язовим введенням ізадрину в дозі 60 мг/кг протягом 4 діб. Визначають розмір зони некрозу, показники перекисного окислення ліпідів (МДА, дієнові кон'югати, шифові основи), антиоксидантного захисту (активність супероксиддисмутази, каталази, рівень відновного глутатіону, глутатіонпероксидази, церулоплазміну). Ізадриновий міокардит викликають також у котів при внутрішньовенному введенні ізадрину в дозі 100 мг/кг.

### ***2.14. Модель ушкодження міокарда при стресі***

Стресорні ушкодження міокарда у щурів викликають 3-годинним іммобілізаційним стресом при попередньому 24-годинному голодуванні. Визначають показники перекисного окислення ліпідів, антиоксидантного захисту, проводять електронну мікроскопію міокарда.

### ***2.15. Інші методи дослідження антиішемічної активності***

Ці експерименти проводять на моделях оклюзії передньої гілки низхідної коронарної артерії в середній її третині у собак та кролів (інфаркт міокарда) (Г.В. Ковальов та ін., 1983), у щурів на рівні нижнього краю вушка передсердя; мікротромбозу коронарних артерій (Г.В. Ковальов та ін., 1986). Процеси термінової компенсації функції серцевого м'яза можна дослідити за допомогою навантажувальних тестів: навантажування об'ємом (А.П. Савченко та ін., 1988; J. Hartikainen, 1989); проби на адренореактивність (Ф.З. Меерсон, 1981), різні моделі стресу.

## **3. Вивчення впливу потенційних антиангінальних сполук на метаболізм міокарда**

Дисбаланс між доставкою та потребами серця в кисні при коронарній недостатності призводять до тяжких метаболічних порушень в міокарді, які в свою чергу можуть бути пусковими механізмами патологічних процесів, що супроводжують ІХС (серцева недостатність,



аритмія). Тому зміни основних показників енергетичного обміну міокарда під впливом досліджуваних речовин є важливою характеристикою стану серцевого м'язу. Для виявлення їх біологічних механізмів дії можуть бути використані:

- вміст макроергічних фосфатів (АТФ, АДФ, АМФ, КФ) та  $\Phi_n$ , активність креатинфосфокінази, які визначають енергетичний потенціал клітки і дозволяють зробити висновок щодо спрямування дії досліджуваних речовин на їх синтез або утилізацію, а також оцінити ступінь ацидозу –  $[H^+] = [АТФ] [\Phi_n] / [КФ] [АДФ]$ ;

- вивчення впливу досліджуваних препаратів на стан субстратів окислення (глікоген, жирні кислоти), їх метаболітів (лактат, малат, піруват) та активність ключових ферментів (МДГ, ЛДГ, СДГ, ЦСО, цитохромів та ін., що беруть участь в аеробному та анаеробному окисленні в міокарді та інтенсивності транспорту енергії від місць виникнення до місць використання;

- враховуючи, що зворотність ішемічних ушкоджень у міокарді багато в чому визначається станом системи перекисного окислення ліпідів у останньому, необхідним є також вивчення показників, що характеризують зазначену систему (вміст дієнових кон'югатів, малонового діальдегіду, активність пероксидази, супероксиддисмутази, каталази, ліпідограму основ та ін.).

При виконанні робіт, спрямованих на виявлення механізмів метаболічних ефектів досліджуваних речовин, можливе використання додаткових методів дослідження (визначення складу субстратів і активності окремих ферментів гліколізу та циклу трикарбонних кислот, рівня нікотинамідних коферментів, активності ключових АТФ-аз та протеїназ.

## 4. Оцінка протигіпоксичного захисту міокарда

Оцінка протигіпоксичного захисту міокарда проводиться через встановлення впливу засобу на швидкість коронарного кровообігу та прямого впливу на метаболізм клітини, в тому числі енергетичний.

Для аналізу участі біохімічних систем в адаптації міокарда та гіпоксії можуть бути використані такі моделі.

### 4.1. Гемічна гіпоксія

Гемічну гіпоксію відтворюють підшкірним введенням щурам натрію нітрату 50 мг/кг (Н.Ф. Іваницька, 1976). Через 70 хв від моменту введення у міокарді щурів визначають низку біохімічних показників, які характеризують енергетичний обмін (вміст нікотинамідних коферментів, аденілових нуклеотидів, креатинфосфату; активність сукцинат-, малат-, лактатдегідрогеназ, цитохром-С-оксидази).

Для прикладу зазначимо, що вміст окислених форм НАД при гемічній гіпоксії зменшується у середньому на 26%, відношення окислених форм НАД до відновлених форм – на 43%. Рівень АТФ зменшується на 42%, відношення АТФ/АДФ – на 30%. Вміст аденілових нуклеотидів у цілому зменшується в середньому на 28%, вміст креатинфосфату – на 28%. Активність креатинфосфокінази знижується на 22%, малатдегідрогенази – на 21%. Одночасно на 31% підвищується вміст відновлених форм НАД і на 25% у середньому збільшується активність лактатдегідрогенази.

Препарат, який має антигіпоксичну активність, повинен мати можливість нормалізувати, як мінімум, один з вказаних показників енергетичного обміну не менше, ніж на 50%.

### 4.2. Гіпоксична гіпоксія

Моделювання включає «підйом» у барокамері на висоту 8000 м при 2-годинній експозиції. У міокарді також визначають показники енергетичного обміну.

### **4.3. Гіпоксичний вплив на ізольоване серце щурів**

За 1 год до досліду щурам вводять розчин гепарину з розрахунку 2 мг/100 г. Тварин декапітують. Ізольовані серця щурів перфузують за методом Лангендорфа розчином Кребса-Хенселяйта (рН 7,4,  $t=37^{\circ}\text{C}$ ), оксигенованим за допомогою суміші 95% $\text{O}_2$ +5% $\text{CO}_2$ . При цьому вимірюють ЧСС та їх силу за допомогою механоелектричних перетворювачів. Підраховують величину «зовнішньої роботи», яку здійснює серце за одиницю часу в ізотонічному режимі скорочень, і яка дорівнює добутку сили на переміщення і на частоту скорочень. Швидкість засвоєння кисню ( $\text{VO}_2$ ) ізольованим серцем визначають за допомогою полярографічного методу. Як кисневий датчик використовують мембранний електрод Кларка. Вимірювання у поточній полярографічній комірці об'ємом 1–1,5 см<sup>3</sup>.  $\text{VO}_2$  розраховують за різницею вмісту кисню у перфузаті, що притікає та відтікає від серця. Бажаним є моделювання гіпоксичного стану середньої тяжкості (50%  $\text{O}_2$  щодо норми). Можна припинити подання перфузійного розчину на 45 хв. Можна моделювати окислювальний стрес за допомогою 20-хвилинної перфузії ізольованого серця розчином Кребса-Хенселяйта, що містить  $\text{FeSO}_4$  (0,2 ммоль/л) та кислоту аскорбінову (0,5 ммоль/л).

### **4.4. Гіпоксичний вплив на ізольовані препарати міокарда**

Гіпоксію моделюють на ізольованих передсердях, папілярних м'язах щурів та мурчаків. За умов обмеження кисню (50%  $\text{O}_2$ ) проводять реєстрацію основних параметрів скоротливої активності (див. вище). На ізольованих препаратах правого передсердя кроля, які мають зону синусового вузла, вушко правого передсердя, атріовентрикулярний вузол та пучок Гіса включно до фіброзного кільця, моделюють гіпоксію та ішемію видаленням з перфузійного розчину глюкози. При цьому, крім скоротливої активності, реєструють також потенціали дії синусового вузла, передсердя, атріовентрикулярного вузла та пучка Гіса за допомогою електродів-липучок або відведень локальних електрограм.

## **5. Кардіопротекторний ефект антиангінальних засобів**

Антиангінальні засоби покращують стан коронарного кровообігу та кровопостачання міокарда. Вони можуть мати й кардіопротекторний ефект.

У зв'язку з широким застосуванням у практиці методів внутрішньокоронарного тромболітизму, реканалізації склерозованих вінцевих артерій збільшується небезпека реперфузійних ускладнень міокарда. Захист від структурних метаболічних та функціональних змін серцевого м'яза, що виникає внаслідок ішемії та реперфузії, може стати одним з важливих критеріїв оцінки антиангінального та кардіопротекторного ефектів.

Для оцінки цих властивостей досліджуваних сполук можуть бути запропоновані різні критерії: морфологічні, біохімічні та функціональні. Дозоване обмеження коронарного кровообігу в гострому досліді на середніх та великих лабораторних тваринах за умов штучної вентиляції легень та широкої торакотомії з реєстрацією показників кардіодинаміки і системної гемодинаміки є загальноприйнятною моделлю ішемії міокарда. Вивчення кардіопротекторного ефекту повинно проводитись при попередньому (до розвитку ішемії) введенні засобу і подальшому його введенні протягом ішемії та при відновленні коронарного кровообігу.

Функціональними критеріями захисної дії можуть бути: ступінь пригнічення скоротливої активності міокарда (лівошлунковий тиск,  $dP/dt$ , індекси скоротливості, показники жорсткості міокарда, кінцево-діастолічний об'єм), показники системної гемодинаміки, об'ємної швидкості коронарного кровообігу, опір коронарних артерій.

Морфологічним критерієм кардіопротекторного ефекту може бути ступінь вираженості ішемічних змін у міокарді (стан плазматичних мембран, скоротливих елементів, мітохондрій,

структур саркоплазматичного ретикулума) після попереднього введення препарату порівняно з контролем (ішемія і реперфузія без введення препарату).

Як найпростіші біохімічні критерії можна використовувати показники рН,  $pO_2$ ,  $pCO_2$  венозної крові коронарного синуса, а також артеріально-венозної реакції цих показників. За наявності у досліджуваної сполуки кардіопротекторного ефекту будуть зменшуватися ступінь зниження рН венозної крові, відтікаючої від ішемізованого міокарда, артеріально-венозна реакція  $pO_2$  і  $pCO_2$ .

За найкращий ефект можна вважати наявність кардіопротекторної дії в умовах введення препарату в період ішемії. Разом з тим низка засобів (антагоністи іонів кальцію) можуть справляти захисну дію на міокард лише за умови їх попереднього введення (до розвитку ішемії). Це слід враховувати при плануванні експерименту.

У цілому клінічне значення кардіопротекторного ефекту значно вище, ніж коронаролітичного, антиангінального, оскільки вирішальне значення щодо прогнозу лікування захворювання має функціональна повноцінність міокарда після перенесеного ішемічного впливу.

## ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНЕ ВИВЧЕННЯ АНТИГІПЕРТЕНЗИВНИХ ЗАСОБІВ

Мохорт М.А.,  
Горчакова Н.О.,  
Чекман І.С.,  
Французова С.Б.,  
Серединська Н.М.,  
Зупанець І.А.,  
Ніженковська І.В.

### Перелік скорочень

**АПФ** – ангіотензинперетворюючий фермент  
**АТ** – артеріальний тиск крові  
**Д** – дебіт крові  
**ЕКГ** – електрокардіограма  
**ЗПО** – загальний периферійний опір  
**КФК** – креатинфосфокіназа  
**ЛАО** – легенево-артеріальний опір  
**ЛДГ** – лактатдегідрогеназа  
**ЛШТ** – тиск крові у порожнині лівого шлуночка серця  
**МДГ** – малатдегідрогеназа  
**ПОЛ** – перекисне окислення ліпідів  
**РІЛШ** – робочий індекс лівого шлуночка  
**РУІЛШ** – робочий ударний індекс лівого шлуночка  
**САТ** – системний артеріальний тиск крові  
**СДГ** – сукцинатдегідрогеназа  
**СІ** – серцевий індекс  
**СпІ** – систолічний індекс  
**СОД** – супероксиддисмутаза  
**ТЛА** – тиск у легеневій артерії  
**ХОК** – хвилинний об'єм крові  
**ЧСС** – частота серцевих скорочень  
**ЦНС** – центральна нервова система  
**+dp/dtmax** – максимальна швидкість зростання тиску крові в шлуночку серця  
**-dp/dtmax** – максимальна швидкість зниження тиску крові в шлуночку серця

## Загальні положення

**Артеріальна гіпертензія** – стан, при якому підвищується артеріальний тиск (АТ) внаслідок збільшення серцевого викиду, судинного опору та об'єму циркулюючої крові. Первинні механізми гіпертонічної хвороби включають також стресову дезадаптацію вищих нервових центрів, затримку в організмі натрію і води, підвищення активності системи ренін-ангіотензин-альдостерон та ін.

Сучасні принципи фармакотерапії гіпертонічної хвороби на основі уявлень про механізми її патогенезу передбачають:

- пригнічення збудження клітин центрів нервової регуляції судинного тонуусу і діяльності серця, структури підкіркового судиннорухового центру;
- зниження хвилинного об'єму крові й периферичного судинного опору;
- зменшення об'єму циркулюючої крові;
- зниження рівня реніну, ангіотензину II, ендотеліну, альдостерону та ін. судиннозвужуючих речовин; підвищення рівня судиннорозширюючих речовин: простагландинів, оксиду азоту, брадикініну;
- блокаду адренергічної іннервації на різних рівнях регуляції: у вазомоторному центрі, всередині нейрона, на пресинаптичних і постсинаптичних адренергічних рецепторах;
- зменшення надходження кальцію до клітин гладеньких м'язів;
- модуляцію потоку калію і натрію.

Залежно від етіологічних факторів, клінічної картини і стадії патологічного процесу для лікування первинної (есенціальної) та вторинної (симптоматичної) гіпертензії використовують різні лікарські препарати.

До основної групи антигіпертензивних препаратів належать:

1. Діуретики (петльові, тiazидні, калійзберігаючі).
2.  $\beta$ -адреноблокатори.
3. Інгібітори ангіотензинперетворюючого ферменту (АПФ).
4. Антагоністи кальцію.
5.  $\alpha_1$ -адреноблокатори.
6. Блокатори рецепторів ангіотензину II.

До додаткової групи антигіпертензивних засобів належать:

1. Стимулятори центральних  $\alpha_2$ -адренорецепторів.
2. Вазодилататори.

До нових антигіпертензивних засобів належать антагоністи імідазольних рецепторів:

1. Моксонідин.
2. Римелтадин.

Найбільш вживана фармакологічна класифікація поділяє антигіпертензивні препарати на такі групи:

### I. *Нейротропні препарати*

1. Снодійні, транквілізатори.
2. Стимулятори центральних  $\alpha_2$ -адренорецепторів (клофелін, гуанфацин, гуанабенз, метилдофа, апраклонідин).
3. Симпатолітики (резерпін, октадин).
4. Гангліоблокатори (бензогексоній, пентамін, гігроній).
5.  $\alpha_1$ ,  $\alpha_2$ -адреноблокатори (фентоламін, пірроксан, тропафен).
6.  $\alpha_1$ -адреноблокатори (празозин, доксазозин, теразозин).
7.  $\beta$ -адреноблокатори (анаприлін – пропранолол, надолол та ін.).
8.  $\beta_1$ -адреноблокатори (метопролол, атенолол, ацебутолол, бісопролол, небівалол, талінолол та ін.).
9.  $\beta_1$ -адреноблокатори,  $\beta_2$ -адреностимулятори (целіпролол).

10.  $\alpha+\beta$ -адреноблокатори (лабеталол, карведилол).

11.  $\alpha_1$ -5-ST1-блокатори (урапідил).

12. Антагоністи імідазолінових 1 рецепторів та  $\alpha_2$ -адренорецепторів (моксонідин).

II. *Периферичні вазодилататори*

1. Артеріальні (діазоксид, гідралазин, міноксидил).

2. Венозні (нітрогліцерин, ізосорбїду динітрат та мононітрат).

3. Змішані (натрію нітропруссид, дибазол, папаверину гідрохлорид, но-шпа, магнію сульфат).

III. *Блокатори кальцієвого току* (ніфедипін, верапаміл, дилтіазем, амлодипін, фелодипін, лацидипін, ісрадипін)

IV. *Активатори калієвих каналів* (нікорандил, пінацидил, міноксидил)

V. *Діуретики-салуретики* (гіпотіазид, фуросемід, торасемід, кислота етакринова, клопамід, спіронолактон, амлорид, терен).

VI. *Інгібітори синтезу ангіотензину II* (каптоприл, еналаприлу малеат, лізиноприл, периндоприл, раміприл, моексиприл, фозиноприл, трандалоприл та ін.).

VII. *Блокатори рецепторів ангіотензину II* (лосартан, ірбесартан, епросартан, вальсартан, кандесартан та ін.).

Аналіз клінічних та експериментальних даних дозволяє сформулювати вимоги до нового препарату для тривалої терапії артеріальної гіпертензії.

Антигіпертензивний (гіпотензивний) лікарський засіб повинен:

1. Знижувати системний артеріальний тиск (САТ) поступово і тривало при пероральному введенні.

2. Знижувати САТ до нормального чи близького до нормального рівня.

3. Не викликати ортостатичну гіпотонію, не порушувати адаптаційних реакцій серцево-судинної системи.

4. Знижувати рівень реніну, ангіотензину II, ендотеліну, альдостерону, підвищувати – прос-тацикліну, брадикініну, оксиду азоту.

5. Знижувати об'єм циркулюючої крові, не погіршуючи при цьому кровопостачання життєво важливих органів.

6. Не викликати тахікардію, не погіршувати функціональних можливостей міокарда (не порушувати процеси швидкої та повільної адаптації серця до збільшеного навантаження і скоротливу здатність міокарда).

7. Не знижувати розумову і фізичну працездатність, не викликати погіршення настрою, процесів навчання, пам'яті, соціальної адаптації.

8. Не збільшувати потребу міокарда в кисні, не роз'сднувати окисне фосфорилювання і дихання.

9. Добре сполучатися з іншими антигіпертензивними засобами для лікування гіпертонічної хвороби.

10. Не викликати звикання і синдрому відміни після припинення прийому препарату, тобто не викликати вторинний гіпертензивний ефект.

11. Знижувати летальність, поліпшувати якість життя.

Гіпертонічний криз характеризується різким і несподіваним підвищенням АТ і потребує швидкого терапевтичного втручання – ліквідації периферичної вазоконстрикції, гіперволемії і церебральних симптомів (судом, блювоти, збудження та ін.). Засобами першого вибору при цьому є швидкодіючі вазодилататори – натрію нітропруссид, нітрогліцерин, ізосорбїду динітрат, діазоксид, гангліоблокатори (арфонад, пентамін), діуретики (фуросемід, кислота етакринова, торасемід, індапамід, гідралазин, ніфедипін, еналаприлат).

Лікування прееклампсії потребує внутрішньом'язового введення гідралазину; блювотних рефлексів – аміназину; для зняття судом використовують магнію сульфат; при загрозі крововиливу в мозок – дибазол. При гіпертонічному кризі, котрий супроводжується набряком легень чи застійною серцевою недостатністю, рекомендують швидко діючі препарати, які зни-

жують перед- і післянавантаження (натрію нітропрусид, пентамін). Для зменшення гіперволемії вводять фуросемід. Лікування гіпертонічного кризу на фоні ниркової недостатності спрямоване на зменшення гіперволемії та вазоконстрикції; превалюють препарати, що підвищують кровотік (гідралазин, метилдофа), на фоні феохромоцитомі – фентоламін.

До препарату, який знімає гострі гіпертензивні стани, ставлять такі вимоги:

1. Висока антигіпертензивна активність, специфічний вплив на серцево-судинну систему.
2. Швидке, але не різке зниження САТ, короткотермінова антигіпертензивна дія.
3. Відсутність тахіфілаксії.
4. Зниження перед- і післянавантаження на міокард, відсутність порушення кровопостачання життєво важливих органів.

Уніфікація дослідження антигіпертензивних засобів передбачає виділення більш адекватних, високочутливих і відтворюваних за умов лабораторії методів, які можуть бути рекомендовані для цілеспрямованого вибору і фармакологічного вивчення антигіпертензивних засобів.

Аналіз літературних даних і проведення експериментальних та клінічних досліджень дозволяє констатувати, що єдиним стійким критерієм, що дозволяє визначити антигіпертензивні властивості речовини, є зниження АТ.

### **Програма проведення ідентифікації нових біологічно активних сполук і вивчення їх антигіпертензивної дії**

На основі відомостей про механізми дії та фармакодинаміку антигіпертензивних засобів доклінічна оцінка препаратів повинна бути проведена в два етапи.

#### I етап

Первинний відбір (скринінг) і первинна оцінка гіпотензивних засобів. Основним завданням цього етапу є виявлення у досліджуваних сполук здатності знижувати АТ, а також встановлення параметрів токсичності й нешкідливості. Визначення проводять на 2–3 видах лабораторних тварин, порівнюючи з референтним препаратом.

#### II етап

Поглиблене вивчення впливу потенційно антигіпертензивних засобів на скоротливу активність міокарду, ізольованої аорти, а також показники загальної кардіогемодинаміки, метаболізму серця й аорти інтактних тварин і в умовах експериментальної патології.

## **1. Методичні вказівки щодо доклінічного вивчення нових антигіпертензивних засобів**

### **1.1. Скринінгове дослідження антигіпертензивних засобів**

Скринінгове дослідження принципово нових хімічних сполук і нових сполук, близьких за хімічною структурою до відомих, механізм дії яких вивчений, практично не відрізняються.

Антигіпертензивні властивості біологічно активних сполук вивчаються на нормотензивних тваринах (щури, кролі, коти та ін.), а також на тваринах з експериментальною гіпертензією.

Вимірювання рівня АТ проводять за допомогою електроманометра, за відсутності такого – ртутним манометром Людвіга. САТ вимірюють у сонній чи стегновій артерії піддослідних тварин, попередньо паркотизованих нембуталом (30 мг/кг, внутрішньоочеревинно), уретаном з хлоралозою (відповідно 600 і 40 мг/кг). Група включає 5–7 піддослідних тварин.

Після випробування сполук на нормотензивних тваринах проводять експерименти на тваринах (щури) зі спонтанною чи експериментально відтвореною гіпертензією. Ефект препаратів з очікуваною β-адреноблокуючою дією встановлюють на фоні ізопроterenолу (ізадрину), а інгібіторів АПФ на фоні ангіотензінаміду.

Для реалізації завдання спочатку перевіряють: чи має фармакологічний засіб антигіпертензивний вплив у стандартній великій дозі. Для цього виконують 2 серії досліджень по 3–4 досліди.

У першій серії фармакологічний засіб вводять всередину щурам зі спадковою гіпертензією. Перед цим вживлюють тваринам поліетиленовий катетер у стегнову або сонну артерію для прямої реєстрації АТ.

Протягом 6 годин після введення препарату реєструють АТ та частоту серцевих скорочень (ЧСС). Для проведення експерименту необхідний електроманометр з малим об'ємом зміщення (не більше 0,1 мм/100 мм рт.ст.), кардіотахометр, що запускається пульсовою хвилею АТ, та двоканальний реєстратор. Фармакологічний засіб досліджують далі, коли під його впливом АТ знижується на 25 мм рт.ст. або більше на період 2 і більше годин.

Завданням другого етапу досліджень є виявлення можливої антигіпертензивної дії, її тривалості, порівняння ефекту з еталонним препаратом. За даної постановки досліду нові сполуки доцільно вводити внутрішньовенно в дозі до 5 мг/кг маси (високоактивні речовини типу блокаторів кальцієвих каналів вводять внутрішньовенно у дозах до 100 мг/кг маси). Реєстрацію САТ переважно проводять протягом 3–6 годин. При поганій розчинності речовини у вигляді зависі можна вводити всередину за допомогою зонда, катетера чи спеціальної голки, збільшивши дозу до 50 мг/кг.

У тварин вимірюють не тільки АТ, але й ЧСС. У зв'язку з відсутністю гіпотензивної дії у нормотензивних тварин при одноразовому введенні  $\beta$ -адреноблокаторів, інгібіторів АПФ, блокаторів рецепторів ангіотензину II, протокол досліду включає введення стандартної дози ізадрину та ангіотензину II до і після введення досліджуваних речовин.

Речовини, що знижують САТ на 25 мм рт.ст., заслуговують на увагу з метою глибшого вивчення, яке проводять у порівнянні з еталонними препаратами відповідного механізму дії, обираючи при цьому клофелін, анаприлін, ніфедипін, каптоприл, лосартан.

Для цього спочатку визначають механізм дії антигіпертензивної сполуки. На наркотизованих котах або собаках визначають АТ, ЧСС, ЕКГ, тиск у порожнині лівого шлуночка, першу похідну лівошлуночкового тиску, кінцеводіастолічний тиск у лівому шлуночку, тонус третього віка. Проводять дослідження на фоні болюсного внутрішньовенного введення агоніста  $\alpha_1$ -адренорецепторів – мезатону, агоніста  $\beta$ -адренорецепторів – ізадрину, симпатоміметика – тираміну, ангіотензину I та II. Про вплив фармакологічного засобу на гангліонарну провідність судять на підставі зміни скоротливої відповіді миготливої перетинки (третього віка), викликаній подразненням прегангліонарних та післягангліонарних волокон шийного симпатичного нерва. Можливі ефекти досліджуваного препарату на дію фармакологічних аналізаторів дозволяють обґрунтувати вибір препарату порівняння.

Тварину підігрівають під час досліду, щоб температура тіла була в межах 37–38°C. У кожній лабораторії є стандартні дози фармакологічних аналізаторів – агоністів і антагоністів різних рецепторів. Визначають  $ED_{50}$ , а також  $LD_{50}$ , терапевтичний індекс  $TI = LD_{50}/ED_{50}$ .

Кількісну оцінку антигіпертензивної активності ( $ED_{20}$ ) проводять на щурах на моделі, застосування якої надає більше можливостей для виявлення антигіпертензивної дії. Так, зокрема, інгібітори АПФ найефективніше досліджуються на щурах з двонирковою моделлю гіпертензії і звуженням однієї ниркової артерії зі збереженням інтактною іншої нирки, тому що в перші тижні розвитку гіпертензії підвищується активність ренін-ангіотензинової системи. Більшість інших сполук вивчають на спонтанно-гіпертензивних групах з ДОКА-сольовою гіпертензією. Антигіпертензивну дію  $\beta$ -адреноблокаторів важко визначити в дослідах з одноразовим введенням, краще при прямому вимірюванні АТ.

Гостра токсичність ( $LD_{50}$ ) визначається на щурах і мишах. На етапі скринінгу порівнюють фармакодинаміку нового та референтного фармакологічних засобів за силою, тривалістю антигіпертензивного ефекту, терапевтичною широтою і можливими побічними ефектами. Існує можливість визначення переваг досліджуваного лікарського засобу.



На новому етапі проводять також кількісну оцінку антигіпертензивної активності (ЕД<sub>20</sub>, ЕД<sub>30</sub>) паралельно зі встановленням такої для еталонних сполук на щурах чи кролях з тим типом експериментальної гіпертензії, котрий є найбільш чутливим до впливу сполук з даним механізмом дії.

## **1.2. Поглиблене вивчення антигіпертензивних речовин**

При поглибленому експериментальному вивченні антигіпертензивних речовин експериментатор виділяє наступні етапи:

1. Дослідити видову чутливість піддослідних тварин до судинного впливу речовини.
2. Виділити питому вагу серцевого і судинного компонентів у гіпотензивному впливі.
3. Встановити фізіологічний механізм антигіпертензивного впливу.
4. Вивчити молекулярні (біохімічні) механізми гіпотензивного впливу.
5. З'ясувати вплив досліджуваної речовини на кровообіг життєво важливих органів.
6. Вивчити вплив досліджуваної речовини на центральні вазомоторні структури та на базові показники центральної гемодинаміки.
7. Вивчити ефективність речовини за умов багаторазового (курсного) застосування.
8. Вивчити вплив речовин на моделях гіпертензії.
9. Визначити вплив фармакологічного засобу на рівень катехоламінів та активність реніну в плазмі крові.
10. Визначити можливий негативний вплив фармакологічного засобу на розумову працездатність, процеси навчання, пам'яті.

Додаткове завдання:

1. Вивчення впливу фармакологічного засобу на гладенькі м'язи.
2. Порівняльне вивчення дії фармакологічного засобу на тонус резистивних і емкісних судин, приток крові до серця.
3. Вивчення впливу фармакологічного засобу на буферні судинні рефлекси в нормі і за умов емоціонально-больового впливу.
4. Вивчення впливу фармакологічного засобу на спонтанну та викликану стимуляцією різних центральних структур активність в преангіонарних та післяангіонарних волокнах спінальних нервів.

Обов'язковими у поглибленому вивченні антигіпертензивних речовин є етапи 1, 2, 7, 8.

У випадку дослідження нової сполуки як потенційного антигіпертензивного засобу при поглибленому вивченні слід виконати усі вказані етапи роботи (1–8).

### *1.2.1. Вивчення видової чутливості до гіпотензивної дії нової речовини*

Дослідження проводять на 2–3 видах тварин (бажано щури, коти чи собаки), один з яких не належить до гризунів. У групі має бути 3–5 тварин.

Шлях введення речовини слід обирати заздалегідь, згідно з передбачуваним шляхом введення у клініці. Речовину вводять в ефективній дозі, яка визначається при вивченні залежності доза-ефект (скринінгове дослідження), відповідно на 3–5 тваринах кожного виду. Рівнозначна або ж близька до неї ефективність речовини у різних видів тварин дає можливість з більшою впевненістю екстраполювати отримані результати на людину.

### *1.2.2. Вивчення впливу нової речовини на системну кардіо- і гемодинаміку*

Виконання цих досліджень потребує відповідної апаратури.

Найадекватнішим з цієї метою є дослідження за допомогою існуючих комплексних систем, укомплектованих електроманометрами і флоуметрами з електромагнітними чи ультразвуко-

## Оцінка специфічної фармакологічної активності лікарських засобів

вими датчиками. Дослідження впливу фармакологічних засобів можна проводити на щурах (180–250 г), кролях (2,5–5 кг), котах (2–4 кг).

Дослідження бажано проводити на собаках (маса 10–25 кг), котрі перебувають під наркозом в умовах відкритої чи закритої грудної клітки. Наркоз – нембутал 50 мг/кг, уретан з хлорало-зою 600 та 40 мг/кг, відповідно.

При поглибленому дослідженні нових сполук вивчають усі перелічені нижче показники, а саме:

- $+dp/dt_{max}$  – максимальна швидкість наростання тиску в шлуночках серця;
- $-dp/dt_{max}$  – максимальна швидкість зниження тиску в шлуночках серця;
- АТ – артеріальний тиск (середній, систолічний, діастолічний);
- ТЛА – тиск у легеневій артерії (систолічний, діастолічний, пульсовий);
- ЛАО – легенево-артеріальний опір;
- ЛШТ – тиск у порожнині лівого шлуночка серця;
- ХОК – хвилинний об'єм крові;
- ЧСС – частота серцевих скорочень;
- ЕКГ – електрокардіограма у 2-ому стандартному відведенні;
- об'ємна швидкість кровотоку (у випадку закритої грудної клітки об'ємна швидкість кровотоку вимірюється в одній з сонних артерій).
- максимальний кровотік.
- максимальна лінійна швидкість.
- максимальне прискорення.

САТ вимірюють електроманометром або ртутним манометром Людвіга в загальній сонній або стегновій артерії.

Отримані результати за необхідності використовують для розрахунку індексів скоротливості і розслаблення міокарда.

Для з'ясування можливого впливу речовини на коронарний кровообіг досліди проводять на собаках, переведених на штучне дихання за умов широкої торакотомії. При цьому хірургічним шляхом розтинають сікард, виділяють огинаючу частину лівої коронарної артерії, на яку накладають відповідного розміру флоуметричний датчик. Об'ємна швидкість кровообігу в коронарній артерії реєструється в динаміці до і після введення речовини. Метод є досить об'єктивним, але потребує спеціальної підготовки і навичок.

Для визначення ХОК придатним є метод термодилуції (собаки 10–25 кг, кролі 2,5–5 кг, щури 180–250 г, коти 2–4 кг) (М.І.Гуревич, С.А.Берштейн, 1979). Цей метод дає достовірні дані про значення серцевого викиду. Недоліком методу є дискретність визначення показників ХОК. Під час експерименту реєструють ЕКГ. Замість ЗПО розраховують питомий периферичний опір:  $ППО = АТ / ХОК$  кг маси тварини.

ХОК можна реєструвати методами тетраполярної реографії, електромагнітної або ультразвукової флоуметрії.

Електромагнітна та ультразвукова флоуметрія потребує відповідного оснащення, переведення тварини на штучне дихання та складних хірургічних маніпуляцій – розкриття грудної клітки, виділення висхідної частини аорти, накладання на неї датчика. При цьому методи можливе безперервне спостереження за динамікою серцевого викиду та можливість реєстрації першої похідної сигналу кровообігу в аорті, за якою можна робити висновок про контрактильність лівого шлуночка.

У випадку виявлення змін на ЕКГ у II стандартному відведенні реєструється ЕКГ у 3-х стандартних відведеннях. Далі розраховуються всі показники (на основі заданої програми):

- Д – дебіт крові;
- ЗПО – загальний периферичний опір;
- РІЛШ – робочий індекс лівого шлуночка;
- РУІЛШ – робочий ударний індекс лівого шлуночка;

СІ – серцевий індекс;

СiI – систолічний індекс.

При вивченні ресинтезованих засобів або лікарських форм препаратів, виготовлених на основі імпортованих субстанцій, обов'язково вивчаються такі показники:

+dp/dtmax – максимальна швидкість наростання тиску в шлуночках серця;

-dp/dtmax – максимальна швидкість зниження тиску в шлуночках серця;

P dp/dt – тиск у порожнині лівого і правого шлуночків серця в момент піку dp/dt;

АТ – артеріальний тиск (середній, систолічний, діастолічний);

ТЛА – тиск у легеневій артерії (систолічний, діастолічний, пульсовий);

ЛАО – легенево-артеріальний опір;

ЛПШТ – тиск в порожнині лівого шлуночка серця;

ХОК – хвилишний об'єм крові;

ЗЛО – загальний легеневий опір;

ЗПО – загальний периферичний опір;

ПШТ – тиск в порожнині правого шлуночка серця;

УОК – ударний об'єм крові;

ЧСС – частота серцевих скорочень.

Для вивчення можливого безпосереднього впливу речовини на міокард використовують ізольоване передсердя щура, мурчака, що спонтанно скорочується, а також панілярний м'яз серця тварин. Прямий вплив речовини на судинну стінку може вивчатись із використанням ізольованих смужок судин чи у дослідах на ізольованому вусі кролика, що перфузується, за Н.В.Кравковим, С.А.Писемським.

На підставі отриманих даних дослідник робить висновок щодо участі серцевого і судинного компонентів у гіпотензивному ефекті речовини.

### 1.2.3. Вивчення впливу речовини на кровообіг у життєво важливих органах

У дослідах даної серії оцінюють вплив нової речовини на об'ємну швидкість кровообігу в органі, що цікавить дослідника. Для цього найбільш раціонально використовувати метод ультразвукової чи електромагнітної флоуметрії. Досить зручним та інформативним є метод з використанням мікросфер, мічених ізотопами, що дозволяє одночасно визначати об'ємну швидкість кровообігу в багатьох органах і тканинах (О.С.Медведєв та співавт., 1983).

Про негативний вплив нової речовини на коронарний кровообіг роблять висновки на підставі зміни сегменту ST на ЕКГ в нормі та при тимчасовій ішемії міокарда до і після введення.

### 1.2.4. Вивчення фізіологічних механізмів гіпотензивної дії

Вивчення фізіологічних механізмів гіпотензивної дії пов'язане з впливом на ті чи інші рецепторні утворення.

Для цього речовину вводять внутрішньовенно у дозі ЕД<sub>20</sub> для кожного виду тварин. До і після введення, шляхом використання відповідних агоністів та антагоністів, проводять тестування різних типів рецепторів, що беруть участь в регуляції діяльності серцево-судинної системи. Зміни гемодинамічних показників внаслідок використання агоністів та антагоністів різних рецепторів дають можливість тим чи іншим чином класифікувати досліджувану речовину. Аналіз дії речовин проводиться на наркотизованих тваринах (щури, коти, собаки, кролики) при ресстрації САТ, ЧСС, ЕКГ, тиску в порожнині лівого шлуночка, першої похідної лівошлуночкового тиску, кінцево-діастолічного тиску в лівому шлуночку, тонуусу третього віка. Для аналізу механізму дії нової сполуки досліджуються її ефекти на фоні введення агоніста  $\alpha$ -адренорецепторів (мезатону),  $\beta$ -рецепторів (ізадрину), симпатоміметика (ефедрину, тираміну), ангіотензину I і ангіотензину II. Вплив на гангліонарну активність вивчають за зміною ско-

## Оцінка специфічної фармакологічної активності лікарських засобів

ротливих відповідей миготливої перетинки kota (третього віка), викликаних подразненням пре- і післягангліонарних волокон шийного симпатичного нерва.

### *1.2.5. Вивчення метаболічних (біохімічних) механізмів гіпотензивної дії*

Гемодинамічні ефекти будь-якої хімічної сполуки переважно обумовлені змінами метаболізму міокарда та судинної стінки. З цієї метою в міокарді та судинній стінці вивчають:

1. Вміст і розподіл K, Na, Ca, Mg.
2. Вміст аденілових нуклеотидів, креатинфосфату, цАМФ, цГМФ, NO.
3. Вміст нікотинамідних коферментів.
4. Вміст лактату, пірувату, глюкози, їх співвідношення (тканини, кров).
5. Вміст ненасичених жирних кислот, ліпідограму та ін.
6. Активність ферментів лактатдегідрогенази, сукцинатдегідрогенази, малатдегідрогенази, креатинфосфокінази, каталази, супероксиддисмутази, NO-синтетази, глутатіонпероксидази та ін.
7. Вміст показників перекисного окислення ліпідів.

### *1.2.6. Вивчення центрального компонента в механізмі антигіпертензивної дії речовини*

Для з'ясування центрального компоненту в дії речовин найчастіше використовують спінальних тварин чи тварин зі зруйнованим спинним мозком. Нерідко також використовують внутрішньощлуночкове введення досліджуваних речовин.

Відсутність впливу досліджуваної речовини на фоновий рівень тиску у тварин із зруйнованим мозком чи зниження тиску при внутрішньощлуночковому введенні інтактним тваринам дозволяє судити про центральні механізми гіпотензивного ефекту.

Електрична стимуляція прегангліонарних симпатичних волокон у тварин зі зруйнованим мозком здійснюється за допомогою спиці з нержавіючої сталі, яка знаходиться у спинномозковому каналі. Неізолювана ділянка спиці-електроду може бути встановлена на різному рівні каналу для вибіркової стимуляції судинних (рівень нижніх грудних і верхніх поперекових сегментів) або серцевих (рівень верхніх грудних сегментів) симпатичних волокон. Відсутність впливу досліджуваного фармакологічного засобу на фоновий рівень тиску і пресорні реакції, викликані електричною стимуляцією у тварин зі зруйнованим мозком, свідчать про центральний механізм антигіпертензивної дії. Фармакологічний засіб можна вводити внутрішньовенно та в хребетну артерію. Коли однакове зниження АТ може бути викликано малою дозою фармакологічного засобу внутрішньоартеріально або значно більшою – внутрішньовенно, то говорять про центральний механізм антигіпертензивного ефекту.

### *1.2.7. Використання моделей гіпертензії при проведенні досліджень*

Кількісну оцінку і з'ясування гіпотензивного ефекту досліджуваної сполуки рекомендується проводити на тваринах з експериментальною гіпертензією. Модель експериментальної гіпертензії повинна бути найбільш адекватною передбачуваному механізму дії досліджуваної сполуки. Універсальною слід признати гіпертензію для всіх механізмів дії у спонтанно гіпертензивних щурів різних ліній (Okamoto, Aoki та ін.). Однак, у зв'язку зі складністю у розведенні цих тварин, більш прийнятними є такі моделі експериментальної гіпертензії:

1. Двониркова модель. Суть її полягає у звуженні ниркової артерії і збереженні другої нирки інтактною. Методика: наркотизованим тваринам проводять розтин черевної стінки і, за допомогою лігатури, спіралі чи спеціального дозуючого затиску, проводиться звуження просвіту однієї з ниркових артерій на 50–70%.

2. ДОКА-сольова гіпертензія за Armstong J.M., Massingham R. (1981). Модель забезпечує збільшення УОК, зміну реактивності судин, підвищення загального і периферичного опору.

Рівень АТ підвищується на 40–60 % протягом двох тижнів.

3. Індометацинова модель (Р.І. Соколова та співавт., 1977). Суть методу полягає у введенні шурам індометацину – інгібітора синтезу простагландинів на фоні зміни функціонального стану нирок шляхом сольового навантаження чи нефректомії.

Ця модель забезпечує збільшення УОК, підвищення реактивності судин, підвищення периферичного опору.

Залежно від механізму дії сполуки можуть бути рекомендовані також моделі стресорної гіпертензії, нейронна модель (ушкодження ядра солітарного тракту), денервація аортальних і каротидних рецепторів.

Окрім хронічних моделей для дослідження механізмів антигіпертензивної дії можуть використовуватись експерименти з підвищенням АТ у гострому досліді різними методами:

1. Використання адrenomіметиків (вивчення антигіпертензивної активності β-адреноблокаторів).

2. Використання кофеїну (вивчення антигіпертензивної активності антагоністів кальцію).

3. Гостра коарктація аорти (у гострому досліді на собаках).

У всіх випадках повинен використовуватись комплекс експериментальних моделей патології, найбільш адекватних передбачуваному механізму дії досліджуваної сполуки (для ресинтезованих препаратів – одна найбільш адекватна модель).

#### *1.2.8. Вивчення ефективності нової речовини при багаторазовому (курсному) введенні*

Досліди проводять на тваринах (шури, кролі, собаки) з експериментальною гіпертензією. Препарат вводять аналогічно передбачуваному клінічному застосуванню. Проводять періодичний контроль рівня АТ (можуть використовуватись непрямі методи вимірювання АТ).

Отримані результати дають можливість з більшою імовірністю говорити про ефективність речовини в клінічній практиці.

#### *1.2.9. Вивчення впливу сполук на деякі морфологічні зміни при гіпертензії*

Розвиток гіпертензії як у клініці, так і при відтворенні в експерименті супроводжується специфічними морфологічними змінами в різних органах: нирках, судинній стінці, міокарді, перивовій тканині та ін. Сполуки, що мають антигіпертензивну дію, попереджують їх виникнення чи сприяють їх зворотному розвитку. У зв'язку з цим може бути використаний морфологічний контроль за розвитком найбільш суттєвих структурних порушень при відтворенні експериментальної гіпертензії. Так, контроль за розвитком гіпертрофії міокарда лівого шлуночка може бути використаний як критерій оцінки ефективності гіпотензивної дії при моделюванні гіпертензії.

#### *1.2.10. Вивчення впливу фармакологічного засобу на рівень катехоламінів і активність реніну плазми крові*

Кров для біохімічного дослідження рівня катехоламінів та активності реніну беруть у різних серіях дослідів. Ці досліді сприяють визначенню специфічної активності порівняно з референтним препаратом.

#### *1.2.11. Вивчення можливого впливу фармакологічного засобу на розумову працездатність, процеси поведінки, навчання, пам'яті*

Вивчення впливу фармакологічного засобу на орієнтовно-дослідницьку (емоційно-рухову) діяльність проводять в тесті «відкрите поле» (Т.О.Вороніна, С.Б.Середенін, 1998). При цьому оцінюють час виходу з центру (латентний період орієнтації тварин), число досліджуваних

квадратів (горизонтальна, рухова активність), число актів грумінгу (комфортність), а також число актів дефекації, сечовиділення (емоційність, емоційний неспокій). Ці показники дозволяють визначити психотропний вплив досліджуваного лікарського засобу.

Вплив цього засобу на елементи навчання та пам'яті проводять за методом Т.А.Воропіної, Р.У.Островської (1998). Вплив фармакологічного засобу при цьому включає пасивне уникнення з негативним (больовим) підкріпленням (УРПУ). Реєструють відсоток тварин, що не уникають світлої камери, латентний період виходу з темної камери при першому пред'явленні, латентний період входу в темну камеру через 24, 48 годин після навчання. Активне уникнення з негативним (больовим) підкріпленням (УРАУ), що включає реєстрацію середньої кількості вірних відповідей і залежності від кількості пред'явлення, кількість тварин, що досягають критерію навчання при даному виді випробувань, середнє значення больового порогу, середня кількість міжсигнальних реакцій, відсоток помилкових відповідей при дослідженні пам'яті, швидкість згасання навичок. Це дає можливість встановити позитивний або негативний ефект на функції ЦНС, що має суттєве значення для визначення перспективності досліджуваної речовини як антигіпертензивного засобу.

При вивченні антигіпертензивного засобу проводять також додаткове дослідження.

1. Вивчення впливу фармакологічного засобу на м'язи судин. Дослідження проводять на фоні  $\alpha$ - або  $\beta$ -адреноблокаторів у дослідах на ізольованих судинах. Можливі дослідження на ізольованому відрізку тонкої кишки на моделі барієвого спазму. Спазмолітична активність свідчить про міотропну дію. Класичними є досліди впливу фармакологічно активних сполук на ізольованому перфузованому вусі кроля (Н.В.Кравков, С.А.Пісемський). Перфузію проводять при кімнатній температурі 20–23°C. Оцінюють ефект досліджуваної сполуки порівняно з блокаторами гістамінових,  $\alpha$ -,  $\beta$ -адренорецепторів, серотонінових, ангіотензинових рецепторів. Визначають вплив досліджуваної сполуки на судинний тонус, пресорні реакції, спричинені норадреналіном, ангіотензином II, ефедрином, тираміном. Визначають антагоністи судиннорозширюючої дії досліджуваної речовини.

2. Порівняльне вивчення дії фармакологічного засобу на тонус резистивних та емкісних судин, на притік крові до серця. Емкісні судини відіграють роль у виникненні артеріальної гіпертензії; підвищення їх тонусу веде до підвищення притоку крові до серця, підвищенню серцевого вмісту. Метод акумулографії, запроваджений Д.П.Дворецьким (1967), дозволяє визначити зміни тонусу резистивних та емкісних судин.

3. Вивчення впливу фармакологічного засобу на буферні судинні рефлекси в нормі і в умовах емоційно-больового впливу. Дослідження виконують на наркотизованих тваринах при визначенні пресорного рефлексу (короткотермінове стискування загальної сонної артерії оклюдером різної конструкції) та депресорного рефлексу (кардіохронотропний компонент барорефлексу) при підвищенні АТ на 30–40 мм рт.ст, викликаного введенням мезатону або норадреналіну.

4. Вплив фармакологічного засобу на спонтанну, викликану стимуляцією центральних структур або різних еферентів активність в прегангліонарних (біла сполучникова гілочка) та післягангліонарних (нирковий та нижньосерцевий нерви) волокнах симпатичних нервів.

Досліди проводять на наркотизованих тваринах з інтактним мозком, депереброваних (міжколікулярне перев'язування) та спінальних (перерізування спинного мозку по С<sub>1</sub> або С<sub>8</sub>) котах. Спонтанна та викликана активність у пре- та післягангліонарних волокнах реєструється за стандартними методами (В.А.Цирлін, 1975). Судинні пресорні і депресорні реакції АТ та електрофізіологічні відповіді у відповідних нервах викликаються прямою та непрямою активацією довгастого і спинного мозку.

Наприкінці слід відмітити, що при проведенні доклінічних випробувань ресинтезованих препаратів об'єм досліджень може бути суттєво скорочений і включати лише оптимальний набір методик для оцінки антигіпертензивної дії. Разом з тим об'єм досліджень нових оригінальних сполук може бути розширений з метою дослідження механізмів дії та впливу на інші органи і системи організму.

## ВИВЧЕННЯ ГІПОЛІДЕМІЧНИХ ТА ПРОТИАТЕРОСКЛЕРОТИЧНИХ ЗАСОБІВ

Горчакова Н.О.,  
Дроговоз С.М.,  
Чайка Л.А.,  
Чекман І.С.,  
Туманов В.А.,  
Братусь В.В.,  
Французова С.Б.,  
Купраш Л.П.,  
Олійник С.А.

Протиатеросклеротичні засоби – це лікарські засоби, які попереджають розвиток або сприяють регресії атеросклеротичного процесу.

В основі розвитку атеросклерозу лежать порушення ліпідного обміну, в першу чергу, обміну холестерину. Ліпіди в плазмі крові утворюють комплекси з білками – ліпопротеїни, які здатні проникати у внутрішню оболонку стінки артерій. Розрізняють 5 класів ліпопротеїнів:

- хіломікрони, які транспортують тригліцериди їжі до місць їх утилізації;
- ліпопротеїни дуже низької щільності (ЛПДНЩ або пре- $\beta$ -ліпопротеїни), які містять переважно ендogenous тригліцериди;
- ліпопротеїни проміжної щільності (ЛППЩ), які містять приблизно рівні кількості тригліцеридів та холестерину;
- ліпопротеїни низької щільності (ЛПНЩ), які містять значну кількість холестерину;
- ліпопротеїни високої щільності (ЛПВЩ або  $\alpha$ -ліпопротеїни), які містять 50% білків.

Щільність ліпопротеїнів залежить від ліпідної компоненти: чим вищий вміст ліпідів, тим меншою є їх щільність.

Атерогенну дію мають ЛПДНЩ, ЛППЩ і ЛПНЩ, які містять значну кількість тригліцеридів і холестерину. При взаємодії з ліпопротеїновими рецепторами судин атерогенні ліпопротеїни вивільняють холестерин. Останній у вигляді складного ефіру відкладається в інтимі, що сприяє розвитку атеросклерозу. В той же час, підвищення концентрації ЛПВЩ, які містять  $\alpha$ -протеїни, перешкоджає атеросклеротичному ураженню судин за рахунок вилучення холестерину з стінки артерій. Важливою ланкою атерогенезу є порушення функціонування кінінової системи артеріальної стінки та порушення в системі згортання крові.

Мішенню для атерогенних ліпопротеїнів є судинна стінка. Тому протиатеросклеротичні засоби повинні прямо або опосередковано захищати стінку судин від розвитку атероматозного процесу, тобто бути ангіопротекторами.

Залежно від переважного впливу на різні ланки розвитку атеросклерозу, протиатеросклеротичні засоби поділяють на дві групи:

### ***I. Ангіопротектори опосередкованої дії.***

#### **1. Гіполідемічні засоби.**

а) засоби, які переважно знижують рівень холестерину:

- інгібітори абсорбції холестерину (типу холестираміну, поліспоніну);
- інгібітори синтезу холестерину (типу ловастатину, симвастатину);

## Оцінка специфічної фармакологічної активності лікарських засобів

– засоби, які активують метаболізм і виведення холестерину з організму (типу лінетолу, ліпостабілу (есенціале));

б) засоби, які переважно знижують рівень тригліцеридів (клофібрат (місклерон), безафібрат, гемфіброзил, кислота нікотинова).

2. Антикоагулянти (гепарин).

3. Антиагреганти (диніридамол (курантил), кислота ацетилсаліцилова).

### II. Ангіопротектори прямої дії.

1. Ендотеліотропні засоби (пармідин).

2. Блокатори кальцієвих каналів (верапаміл, фенігідин (ніфедипін) тощо).

3. Антиоксиданти (токоферолу ацетат, кислота аскорбінова, рутин, кислота глутамінова, цистеїн, метіонін).

Гіполіпідемічні засоби призначають відповідно до характеру дисліпопротеїнемій, які, згідно з класифікацією Всесвітньої організації охорони здоров'я (ВООЗ), поділяють на 5 типів (таблиця 1):

Таблиця 1

Класифікація гіполіпідемічних засобів

Типи дисліпопротеїнемій	Лікарські засоби, що застосовуються для лікування
1. Гіперхіломікронемія	регуляція за допомогою дієти
2а. Гіпер-бета-ліпопротеїнемія	холестирамін, поліспонін, трибуспонін, ловастатин
2б. Гіпер-бета-ліпопротеїнемія та гіперпре-бета-ліпопротеїнемія	ловастатин, кислота нікотинова, клофібрат
3. Дис-бета-ліпопротеїнемія	ловастатин, кислота нікотинова, клофібрат
4. Гіперпре-бета-ліпопротеїнемія	клофібрат, кислота нікотинова

Існує кілька варіантів клінічної класифікації гіпохолестеринемічних засобів. Так, до гіпохолестеринемічних засобів, які знижують рівень холестерину за рахунок ЛПНЩ (можливе деяке підвищення тригліцеридів), відносять секвестранти жовчних кислот, статини (ловастатин) і пробукол; до переважно гіпотригліцеридемічних – фібрати, кислоту нікотинову, риб'ячий жир.

Інший варіант класифікації виходить з механізму дії ліків:

- засоби, які стимулюють видалення ЛПНЩ і діють через рецепторні механізми (секвестранти жовчних кислот і інгібітори ГМГКоА-редуктази);

- засоби, які зменшують швидкість утворення ЛПНЩ, обмежуючи синтез їх попередників – ЛПДНЩ (кислота нікотинова);

- засоби, які прискорюють видалення (кліренс) ЛПДНЩ (фібрати);

- засоби, які стимулюють видалення (кліренс) ЛПНЩ нерцепторним шляхом.

У II доповіді Комітету експертів з виявлення, оцінки та лікування високого рівня холестерину в крові у дорослих запропоновано також класифікацію на основі активності гіпохолестеринемічних засобів щодо зниження рівня холестерину за рахунок ЛПНЩ:

- основні лікарські засоби – секвестранти жовчних кислот, кислота нікотинова і інгібітори ГМГКоА-редуктази (ловастатин та інші статини);

- інші засоби – фенофібрат та інші фібрати, а також пробукол.

Основним показником, яким слід керуватися при призначенні гіполіпідемічних засобів і який повинен використовуватися для контролю ефективності лікування, є рівень холестерину ЛПНЩ.

Ліпідний та ліпопротеїновий спектри сироватки крові експериментальних тварин різних видів різняться (у щурів багато холестерину міститься в антиатерогенних ЛПВЩ, у мурчаків майже повністю – в атерогенних ЛП, у кролів холестерин більш рівномірно розподілений між фракціями ЛП). У зв'язку з цим, для більш об'єктивної оцінки гіполіпідемічної дії нових речовин, досліди рекомендується проводити на двох-трьох видах тварин.

Експериментальне дослідження нових речовин проводять порівняно з референтними препаратами, які застосовують як гіполіпідемічні засоби. Вибір препарату порівняння пов'язаний



з очікуваним механізмом дії та хімічною будовою нової сполуки. Так, при вивченні нових речовин з передбачуваною властивістю зв'язувати жовчні кислоти та/або холестерин в кишечнику та виводити з організму, як препарат порівняння широко використовується жовчний секвестрант холестирамін. У досліджах на щурах-самцях та мурчаках він застосовується в дозах 1,0–1,5 г/кг перорально. Для нових сполук з можливою переважною дією на підвищений вміст ТГ та, відповідно, ЛПДНЩ, найширше використовують фібрати, особливо більш досконали з них – гемфіброзил або безафібрат. У досліджах на лабораторних тваринах (щури, мурчаки, кролі) вони застосовуються в однакових дозах – 50 мг/кг маси тіла перорально. Якщо досліджувана сполука може інгібувати біосинтез холестерину, то як препарат порівняння застосовують ловастатин або флувастатин у дозах 20–50 мг/кг перорально. У випадку передбачуваної додаткової антиоксидантної активності нової речовини з гіполіпідемічною дією, як препарат порівняння використовують пробукол (у досліджах на дрібних лабораторних тваринах – у дозах 50–100 мг/кг перорально).

Попередньо визначають гостру токсичність нових речовин і для дослідження обирають одну й ту саму частину від  $LD_{50}$  (але не більше від 1/10) як нового, так і референтного препарату [5–7].

Використовують різні моделі гіперліпідемії та дисліпопротеїнемії у тварин різних видів. Досліджують спроможність нової сполуки виявляти як профілактичну, так і лікувальну дію.

Профілактична дія пов'язана із спроможністю досліджуваної сполуки знижувати (або повністю попереджувати) розвиток гіперліпідемії та дисліпопротеїнемії, а також атеросклеротичне ушкодження артерій. У цих випадках досліджувану сполуку вводять заздалегідь – протягом кількох днів перед застосуванням агента, який індукує розвиток зазначених порушень. Крім того, профілактичну дію виявляють у випадках одночасного застосування досліджуваної нової речовини з агентом, який призводить до розвитку порушень ліпідного обміну та/або атеросклерозу (наприклад, атерогенної дієти).

Лікувальною дією досліджуваного препарату є його спроможність знижувати рівень вже існуючої гіперліпідемії або сприяти регресії сформованого атеросклеротичного ураження артерій. У цьому випадку досліджувану нову сполуку починають вводити після розвитку названих патологій.

Особливістю вивчення специфічної гіперліпідемічної активності нових речовин є обов'язкове пероральне введення їх тваринам, оскільки препарати цієї групи застосовуються, як правило, перорально. У випадку дослідження активності готової лікарської форми нової сполуки, наприклад, таблеток, враховується вміст діючої речовини, а також кількість та склад допоміжних речовин. Останні вводяться контрольній групі тварин у кількості, відповідній введенню їх дослідній групі у складі таблеток. Останні подрібнюються до порошку та вводяться у складі дієти або через зонд до плунку. По закінченні дослідження дрібних лабораторних тварин забивають декапітацією, кролів – під наркозом пляхом повітряної емболії.

## 1. Моделі гіперліпідемії для вивчення нових речовин

### 1.1. Дослідження гіполіпідемічної дії на щурах

*Модель А.* Індуковані гіперліпідемії можна викликати у щурів масою 200–240 г застосуванням збагаченої холестерином дієти: холестерин (3–5%), тіоурацил (0,3%), холева кислота (1%), можливе додавання вітаміну D (3000–30000 ОД). Дієта застосовується протягом 3–4 тижнів і більше. Тривалість залежить від природи компонентів. Застосування дієти, яка містить вітамін D<sub>2</sub>, протягом кількох місяців призводить до атеросклеротичного ураження аорти. Лікарські засоби, що досліджуються, вводять разом з дієтою. Кров отримують з вени хвоста або після декапітації через 12–18 годин голодування тварин. У крові визначають загальний вміст і спектр ліпідів (ліпопротеїнів) [4].

*Модель Б.* Щурам разом з основним раціоном вводять холестерин (2,4%), 6-метилурацил (0,12%) і підігріту соняшникову олію (30%) [12]. Тривалість досліду становить 15–30 днів. Потім беруть кров для дослідження.

*Модель В.* До раціону додають холестерин (4%), 6-метилурацил (0,12%), соняшникову олію (25%) [14] протягом 14 днів.

*Модель Г.* Дослідження нових речовин на щурах проводять в експериментах на моделі гіперліпідемії, спричиненої детергентом – тритоном WR-1339 (зв'язує ліпіди плазми крові, утворює міцели, ізольовані від дії ЛПІ-ліпази) у дозі 225–250 мг/кг внутрішньоочеревинно одноразово.

Через 8–10 годин після введення тритону WR-1339 рівень тригліцеридів у крові зростає у 6–8 разів, холестерину – в 3–4 рази [23].

Досліджувані речовини вводять перорально одночасно з тритоном або заздалегідь протягом 5 днів, проводячи останнє введення разом з тритоном. Кров отримують у тварин, які голодували на період дії тритону.

### 1.2. Дослідження гіполіпідемічної дії на мурчаках

Оцінку гіполіпідемічної активності проводять зазвичай на мурчаках-самцях масою 500–550 г.

*Модель Д.* Використовують дієту, що містить 1,6% холестерину та 15% рослинної олії. Через 6–10 днів у мурчаків спостерігається гіперхолестеринемія, яка посилюється при більш тривалому введенні [4].

*Модель Е.* Мурчакам перорально протягом 70 діб вводять холестерин у дозі 0,1 г/кг.

У крові і печінці визначають вміст загального холестерину, тригліцеридів,  $\alpha$ -холестерину. Інформативним є також виділення окремих фракцій ліпопротеїнів та вивчення їх складу [4].

Можливе також пероральне застосування холестерину в дозі 0,1 г/кг разом з будь-якими насиченими жирами.

Досліджувані речовини вводять з дією або перед годуванням тварин. Досліджують також вміст холестерину і спектр ліпопротеїнів у крові. Як і в дослідах на щурах, кров отримують через 12–18 годин голодування. Слід зазначити, що у мурчаків рівень ЛПВЩ і  $\alpha$ -холестерину низький, і вплив препарату на ці показники свідчить про вірогідність даних.

### 1.3. Вивчення гіполіпідемічної дії нових речовин на кролях

*Модель Ж.* Експеримент проводять на кролях масою 2,8–3,0 кг, яким протягом 3–4 місяців вводять холестерин (0,2–0,3 г/кг) з їжею або у вигляді розчину в соняшниковій олії через зонд до шлунку. Модель обумовлює гіперхолестеринемію, накопичення атерогенних ліпопротеїнів у крові, збільшення вмісту ліпідів у печінці і холестерину в артеріях, а також атеросклеротичне ураження аорти (за методом плашіметрії ресструється до 40–70% площі аорти, ураженої атеросклеротичними бляшками [4].

*Модель З.* Тваринам вводять 0,5% розчин холестерину в соняшниковій олії (1 г/кг), холевої кислоти (0,1 г/кг) з кормом. Тривалість введення – 30 днів [15]. Потім тварин декапітують. Кров до декапітації отримують з крайової вени вуха.

Викликаючи гіперліпідемію, вводять випробуваний препарат перорально разом з дією. Потім тварин декапітують і беруть кров для дослідження. Для встановлення регресії гіперхолестеринемії препарат вводять протягом 45 днів після створення моделі.

## 2. Кількість ліпідів і ліпопротеїнів у крові

Рівень ліпідів визначають у плазмі, до якої для запобігання згортанню додають ЕДТА (кінцева концентрація 1 мг/мл). Іноді використовують сироватку, однак перевага використання плазми полягає в тому, що ЕДТА підвищує стабільність, і зразки зберігаються довше.

Вміст ліпідів, що визначаються у сироватці, виявляється приблизно на 3% вищим, ніж у плазмі.

Холестерин і тригліцериди визначають у плазмі крові та сироватці ферментативним і хімічними методами. Аналіз аліпопротеїнів (Апо-А-1 і Апо-В) можна провести за методами радіоімунологічного аналізу, радіальної імунодифузії, імунонефелометричного, електроімунологічного чи імуоферментного аналізу.

Визначають, як правило, вміст загальних ліпідів, загального холестерину,  $\alpha$ -холестерину, тригліцеридів, ЛПВЩ і ЛПНЩ в плазмі (сироватці) крові, вміст загального холестерину і тригліцеридів печінки та загального холестерину в аорті експериментальних тварин за загальноприйнятими, описаними в літературі методами. За можливості використовуються автоматизовані методи. Можна рекомендувати застосування наявних у продажу стандартизованих наборів різних фірм для визначення загального холестерину, холестерину ЛП різних класів та тригліцеридів.

### **3. Додаткові методи вивчення нових гіполіпідемічних засобів**

#### **3.1. Вивчення впливу на ліполіз**

До досліду беруть щурів-самців (150–200 г), яким для стимуляції ліполізу в жировій тканині вводять внутрішньоочеревино адреналін у дозі 1,0–1,5 мг/кг. Через 30 хвилин після введення адреналіну визначають рівень НЕЖК (ненасичених жирних кислот) у плазмі (сироватці) крові. Досліджувані речовини вводять перорально одноразово за 1–2 години до ін'єкції адреналіну або заздалегідь протягом 2–5 днів (останнє введення за 1–2 години до ін'єкції адреналіну) [9].

Вивчають також можливу дію нових речовин на вміст НЕЖК у крові інтактних щурів (без введення адреналіну).

Паралельно вивчають вплив нових речовин на ліполіз, який викликається введенням адренортикотропного гормону і теофіліну.

Можливе вивчення впливу нових речовин на ліполіз з використанням жирової тканини або жирових клітин додатку яєчка дорослих тварин [2], які інкубуються у спеціальному середовищі (досліджувані речовини додаються у середовище інкубації в різних концентраціях). Вплив на ліполіз встановлюють за виділенням у середовище інкубації НЕЖК або гліцерину.

#### **3.2. Вивчення впливу на ферментативну активність**

Дослідження впливу на ключовий фермент ГМГКоА-редуктазу в мікросомальній фракції печінки тварин (рідше в розчинній) має значення для з'ясування механізму дії.

З цією метою досліджувані речовини додають в середовище інкубації в різних концентраціях, а також вводять протягом 9–15 днів тваринам (у дозах не більше 1/10 ДЛ<sub>50</sub>), у яких потім встановлюється швидкість біосинтезу ліпідів. У контрольних дослідах вводять лише використовуваний розчинник [4].

Вплив нових сполук на ліпопротеїліназу (ліполітичну активність крові) вивчають для пояснення механізму їх дії, оскільки фермент стимулює гідроліз ліпопротеїнів, багатих на тригліцериди. Вивчення проводять у випадку, якщо виявляють виражене зниження тригліцеридів в ЛПДНЩ.

З цією метою використовують щурів-самців (200–250 г) або кролів-самців (2,5–3,5 кг), яким заздалегідь одноразово або повторно вводять досліджувану сполуку, потім внутрішньо-венно гепарин (50 ОД/г маси тіла). Вихідну пробу крові беруть через 10 хвилин після введення гепарину і визначають активність ліпопротеїлінази (постгепаринову ліполітичну активність крові). У контрольних дослідах вводять відповідний об'єм розчинника [17].

Для з'ясування механізму дії гіполіпідемічної речовини визначають зміну активності альфа-7-гідроксилази холестерину мікросом печінки тварин. Збільшення активності ферменту пов'язане з деградацією холестерину (перша реакція розпаду холестерину до жовчних кислот) [19].

### **3.3. Вивчення впливу речовин на біосинтез ліпідів печінки**

Експерименти проводять з використанням гомогенатів печінки мишей або щурів-самців, які інкубують у спеціальному середовищі з додаванням мічених субстратів ( $1\text{-}^{14}\text{C}$ -ацетат і  $2\text{-}^{14}\text{C}$ -мевалонат). За інтенсивністю включення мітки в кінцеві продукти біосинтезу ліпідів (наприклад, в загальну неомийну фракцію і в жирні кислоти) судять про дію речовини на біосинтез ліпідів в печінці [4].

### **3.4. Вивчення впливу нових сполук на екскрецію жовчних кислот і холестерину**

При дослідженні механізму гіполіпідемічної дії нової сполуки з потенційною здатністю до зв'язування жовчних кислот у кишечнику (подібно до холестираміну) необхідне проведення спеціальних експериментів на щурах, мурчаках, кролях. У наважці калу тварини, зібраного за 24 години, визначається вміст жовчних кислот [10, 21, 24].

Можливе також вивчення впливу нового лікарського засобу на екскрецію холестерину, при цьому вивчають вміст холестерину в наважці калу експериментальних тварин, зібраного за 24 години [24].

### **3.5. Вивчення зв'язування досліджуваної речовини з атерогенними ліпопротеїнами**

Виділені ультрацентрифугуванням ЛПНЩ людини або тварин насичують амонієвою сіллю 8-аніліно-1-нафтол-сульфонату, здатною до флуоресценції. До розчину додають досліджувану речовину і за мірою зменшення флуоресценції судять про інтенсивність зв'язування ЛПНЩ. Як стандарт використовують генарин [8, 20].

### **3.6. Дослідження впливу нових речовин на проникність артеріальної стінки**

У досліджах на кролях, які отримували холестерин, визначають проникність аорти. З цією метою за 1–2 години перед забоем тваринам вводять внутрішньовенно барвник (2 мл 0,5% розчину синього Еванса) і після вилучення аорти планіметрично визначають площу фарбування ендотелію. У контрольних досліджах вводять розчинник [22].

Можливе вивчення впливу нової сполуки на проникнення мічених ЛПНЩ ( $^{125}\text{J}$  ЛПНЩ) в аорту кролів. Для цього ЛПНЩ виділяють з плазми крові кролів за допомогою ультрацентрифугування у відповідному градієнті щільності, вводять радіоактивну мітку в білкову частину ЛП. Потім останні вводять внутрішньовенно кролям (10–20 мг за білком  $^{125}\text{J}$  ЛПНЩ з питомою радіоактивністю  $(20\text{--}40)\cdot 10^6$  імп./хв/мг білка ЛПНЩ), які отримували чи не отримували досліджувану сполуку. Через 6 годин тварин забивають, вилучають аорту, відділяють зовнішню оболонку і вимірюють радіоактивність. Кількість ЛПНЩ, які проникли в аорту, розраховують на масу сухої тканини, враховуючи питому радіоактивність ЛПНЩ [20].

Можна також досліджувати вплив речовини на ступінь набряку (запалення) лапки щура, викликаного введенням брадикініну (0,1 мл 0,01% розчину субплантарно). За онкометричним методом вимірюють ступінь набряку лапки через 30 хв – (1–4) години після введення брадикініну. Антибрадикінінову дію нової сполуки порівнюють з ефектами відомого антибрадикінінового і ангіосклеротичного препарату піридинолкарбамату (ангінін, продектин) [18].

### 3.7. Вивчення антиоксидантної та антирадикальної активності досліджуваних речовин

Зважаючи на роль процесів перекисного окислення ліпідів (ПОЛ) у модифікації ЛП плазми крові та набутті останніми атерогенних властивостей, доцільно визначати вплив досліджуваних речовин на вміст продуктів ПОЛ у плазмі (сироватці) крові, а також їх антирадикальну активність *in vitro*.

#### 3.7.1 Визначення дієнових кон'югатів у плазмі (сироватці) крові

0,5 мл плазми (сироватки) крові екстрагують 5 мл суміші гептан-ізопропанол (1:1 за об'ємом) при струшуванні у закритих пробірках протягом 15 хв. Потім після центрифугування при 10000 об./хв ліпідні екстракти зливають і розбавляють 5 мл суміші гептан-ізопропанол (3:7 за об'ємом). Останню процедуру виконують з метою досягнення оптимальних значень оптичної густини в обох фазах екстракту. До розбавлених ліпідних витяжок додають водний розчин соляної кислоти рН 2,0 в об'ємі 2 мл для розділення фаз та відмивки від неліпідних домішок. Після розділення гептанову фазу відбирають в окрему суху пробірку, а до водно-спиртової фази додають 1 г NaCl для зневоднення ізопропанолового екстракту. Після відділення водної фази ізопропанол переносять в окрему пробірку. Оптичні контролю готують шляхом екстракції за схемою, описаною вище (0,5 мл 0,9% розчину NaCl). Вимірюють оптичну густину кожної фази щодо відповідного контролю при 220 нм (у діапазоні 186–225 нм поглинають ультрафіолетові промені ізольовані подвійні зв'язки) та 232 нм (поглинання відображає вміст дієнових кон'югатів (ДК). Вміст ДК у гептановій та ізопропаноловій фазах розраховують за відношенням  $E_{232}/E_{220}$  [3].

#### 3.7.2 Визначення малонового діальдегіду у плазмі (сироватці) крові

У пробірці змішують 1 мл дистильованої води, 0,5 мл плазми (сироватки) крові, 2 мл 30% розчину трихлороцтової кислоти, 0,2 мл 5 М HCl, 2 мл 0,8% розчину 2-тіобарбітурової кислоти та поміщають у киплячу водяну баню на 15 хв. Після охолодження проби центрифугують при 3000 об./хв протягом 30 хв. У надосадовій рідині вимірюють екстинкцію (E) при довжині хвилі 532 нм в кюветах шириною 10 мм. Вміст малонового діальдегіду у мкмоль/л розраховують за формулою:  $2 \cdot E \cdot 10^4 / 1,56$ . Контрольна проба містить суміш, яка складається з усіх компонентів реакції в тій же кількості, за винятком плазми (сироватки) крові та соляної кислоти [16].

#### 3.7.3 Визначення основ Шифа у плазмі (сироватці) крові

Основи Шифа (ОШ) – це кінцеві продукти ПОЛ, які реєструються за допомогою флуоресцентного аналізу. Припускають, що їх флуоресценція зумовлена легко збуджуваною 6π-електронною кон'югованою системою 1-аміно-3-імінопропенової групи, яка утворюється при біфункціональній реакції МДА з донорами аміногруп. Методика визначення ОШ, що флуоресцують, така. До 0,2 мл плазми (сироватки) крові додають хлороформ-метанольну суміш 2:1. Отриману суміш інтенсивно струшують протягом 5 хвилин. Після цього додають рівний об'єм дистильованої води і знову струшують. Потім суміш центрифугують при 300 об./хв 1–2 хв, а отриманий екстракт розбавляють метанолом 10:1 за об'ємом і проводять спектрофлуориметрію. Максимуми поглинання ліпофусцинових хромофорів, які екстрагуються ліпідними розчинниками, перебувають відповідно в межах 260–280, 340–375 нм, а флуоресценції – у ділянці 420–490 нм. Для водорозчинних ліпофусцинових флуорофорів спектри поглинання та випромінювання перебувають відповідно в діапазоні 270–275 та 310–350 нм [1].

#### 3.7.4 Визначення антирадикальної активності досліджуваних сполук *in vitro*

Антирадикальну активність нових сполук *in vitro* досліджують за їх взаємодією із стабільним радикалом дифенілпікрілгідразилом (ДФПГ). ДФПГ являє собою інтенсивно забарвлене

ну кристалічну речовину з максимумом поглинання у видимій ділянці при 520 нм. Реакції ДФПГ з досліджуваними речовинами проводять у спиртовому розчині, речовини при цьому беруть в еквімолярних кількостях (рекомендовані концентрації речовин становлять  $0,125-0,250 \cdot 10^{-3}$  М). Спиртові розчини речовин змішують, через певні проміжки часу на спектрофотометрі знімають електронні спектри поглинання. Розраховують константу швидкості реакції ДФПГ з досліджуваною сполукою ( $K_{\text{реак}}$ ) та період напівперетворення радикала ДФПГ в нерадикальну форму ( $t_{50}$ ) [13].

### **3.8. Інші біохімічні дослідження**

Для встановлення протекторних властивостей перспективних лікарських засобів додатково можна також вивчати протекторну або лікувальну дію досліджуваного засобу на вміст компонентів аденілатної, креатинкіназної, нікотинамідної систем у крові, плазмі, сироватці і органах тварин, склад і розподіл основних електролітів (калій, натрій, кальцій, магній), рівень глікогену, активність ферментів гліколізу, окислювального фосфорилування, пентозофосфатного циклу, циклу Кребса, аденілатциклазного та інозитолфосфатного циклів тощо.

Таблиця 2

**Етапи доклінічного вивчення гіполіпідемічної активності БАР**

<p>I етап Скринінг гіполіпідемічної активності БАР Вивчення гострої токсичності БАР</p>	<p>- проводиться на щурах (експериментальні моделі А, Б, В, Г) - визначається вплив на показники ліпідограма - визначаються ЕД<sub>50</sub> та ЛД<sub>50</sub> - обирається референтний препарат (наприклад: ловастатин, холестирамін, безафібрат тощо)</p>
<p>II етап Поглиблене вивчення специфічної активності БАР</p>	<p>- на кролях (моделі Е, Ж, З) - на мурчаках (моделях А-Е) - обирається ЕД<sub>50</sub> (на моделях А-Е) - обирається референтний препарат (наприклад: ловастатин, холестирамін, безафібрат тощо)</p>
<p>III етап Вивчення, підгострої і хронічної токсичності БАР</p>	<p>Визначаються: - алергізуюча дія - місцевоподразнююча дія - ульцерогенна дія - тератогенна дія - ембріотоксична дія - мутагенна дія з прогнозом канцерогенності - вплив на органи і системи</p>

### **Література**

1. Барабой В.А., Орел В.Э., Карнаух И.М. Перекисное окисление и радиация.– К.: Наук. думка, 1991.– 256 с.
2. Васильева Л.Е. Действие инсулина и окситоцина на липолитическую активность жировой ткани//Вопр. мед. хим.– 1974.– №3.– С. 265–268.
3. Волчегорский И.А., Налимов А.Г., Яровинский Б.Г., Лифшиц Р.И. Сопоставление различных методов к определению продуктов перекисного окисления липидов в гептан-изопронанольных экстрактах крови//Вопр. мед. хим.– 1989.– Т.35.– Вып.1.– С. 127–131.
4. Горчакова Н.А., Малая Л.Т., Бобров В.А. и др. Методические рекомендации по изучению гиполлипидемических и противоатеросклеротических средств.– К.: Фармакологический комитет МЗ Украины, 1996.– 28 с.

5. Грацианский Н.А. Новые антиатеросклеротические медикаментозные вмешательства//Кардиол.– 1995.– Т.35, №5.– С. 76–80.
6. Коблянская А.В., Смирнова И.П. Роль дислипипротемидемий в развитии и прогрессировании ишемической болезни сердца//Укр. кардиол. журн.– 1995.– №1.– С. 75–79.
7. Козлов С.Г., Лякишев А.А., Титов В.Н. Изучение эффективности и переносимости флувастатина у больных с гипертонической болезнью и гиперхолестеринемией//Кардиол.– 1995.– Т.35, №5.– С. 50–55.
8. Кузнецов А.С., Ховратович В.И., Иоффе Д.В., Попов А.В. Взаимодействие липопротеидов низкой плотности с заряженными лигандами: исследование с помощью флюоресцентного зонда 1-анилинонафталин-8-сульфоната//Вопр. мед. химии.– 1983.– №4.– С. 61–65.
9. Леонтьева Т.П., Казаков А.Л., Рыженков В.Е. Влияние суммы флавоноидов из клевера красного и нута обыкновенного на содержание липидов в крови и печени крыс//Вопр. мед. хим.– 1979.– №4.– С. 444–446.
10. Мирошниченко В.П., Громашевская Л.П., Касаткина М.П. и др. Определение содержания желчных кислот и холестерина в желчи//Лабор. дело.– 1979.– №3.– С. 149–153.
11. Мойсенюк Л.Г., Иванов В.И., Демидов О.А. и др. Гиперлипидемия у белых крыс при длительном скормливаннии им холестерина и возможности ее устранения производными пантотеновой кислоты//Изменение липидного обмена при патологии.– Рига: Зинатне, 1987.– С. 94–100.
12. Окуневич И.В., Ключева Н.Н., Соловьева М.А. и др. Гиполипидемическая активность веществ природного происхождения//Эксперим. и клин. фармакол.– 1992.– Т.55, №5.– С. 44–47.
13. Починюк Т.В., Тараховский М.Л., Портнягина В.А. и др. Экспресс-метод определения антиокислительной активности лекарственных веществ//Хим.-фарм. журн.– 1985.– Т.19, №5.– С. 565–569.
14. Рыженков В.Е., Огурцов Р.П., Трубачева В.В. и др. Влияние тиаминна на развитие экспериментальной гиперлипидемии и атеросклероза//Вопр. мед. хим.– 1988. Т.34, №1.– С. 51–56.
15. Рыженков В.Е., Чистякова А.М., Войцинский Е. и др. Гиполипидемическое действие нового производного дипрофиллина {2-гидрокси-3-(теофиллин-7-ил)} пропилового эфира 4-бензилоксibenзойной кислоты//Вопр. мед. хим.– 1988.– Т.34, №4. - С. 109–112.
16. Сморгюк С.А., Кияшко А.А., Кузив О.Е. и др. Использование биохимических и цитохимических показателей крови для оценки состояния и контроля за эффективностью лечения обожженных: Информ. письмо МЗ УССР. Вып. 22 по проблеме «Хирургия».– К., 1986.– 3 с.
17. Солитернова И.Б., Никульчева Н.Г. Активность постгепариновой липопротеидлипазы плазмы крови кроликов//Вопр. мед. хим.– 1979. - №2. С. 201–209.
18. Шварц Г.Я., Машковский М.Д. Влияние пиридиноккарбамата (пармидина) на некоторые эффекты брадикинина//Фармакол. и токсикол.– 1976.– №2. - С. 176–179.
19. Bjorkhem G., Kallner A. Hepatic-hydroxylation of cholesterol in ascorbate-supplemented guinea pigs//J. Lipid Res.– 1977.– V.167, №1.– P. 9–21.
20. Choch S., Busu M.K., Schweppe G.S. Interaction of l-amino-8-naphtalenesulfonate with human serum LDL//Biochem. Biophys. Acta.– 1974.– V.337.– P. 395–403.
21. Ebert R., Schwabe U. Studies on the antilipolytic effect of adenosine and related compounds in isolated fat cells//Naunyn-Schmiedebergs Arch. Pathol.– 1973.– V.278, №3.– P. 247–259.
22. Friedman M., Byers S. Endothelial permeability in atherosclerosis//Arch. Path.– 1963.– V.76.– P. 99–105.
23. Schurr P.E., Schulz J.R., Parkinson T.N. Triton-induced hyperlipidemia in rats as an animal model for screening hyperlipidemic drugs//Lipids.– 1972.– V.7, №1.– P. 68–72.
24. Uchida K., Nomura Y., Kadowaki M. et al. Effect of dietary cholesterol on cholesterol and bile acid metabolism in rats//Jap. J. Pharmacol.– 1977.– V.27.– P. 193–204.

## **НОРМОВАНІ ВЕЛИЧИНИ ОСНОВНИХ СТРУКТУРНИХ ЕЛЕМЕНТІВ ЕКГ СТАТЕВОЗРІЛИХ ЩУРІВ-САМЦІВ**

Хранак В.В.

### **Вступ**

Електрокардіографія є одним з важливих методів вивчення функції серця за клінічних умов та при експериментальних дослідженнях. Показано, що аналіз структури серцевого циклу дає можливість об'єктивно оцінювати основні функції серця при патологічних станах. Інформація, отримана за допомогою ЕКГ, може бути використана для з'ясування характеру та механізмів біологічної дії різноманітних патогенних факторів на серцево-судинну систему. Для інтерпретації змін структурних елементів ЕКГ під впливом БАР необхідно мати нормовані величини цих елементів. Останнім часом для потреб клініцистів розроблено низку таблиць нормованих величин структурних елементів ЕКГ. Так, була запропонована таблиця нормальної максимальної тривалості інтервалу Q-T при різних величинах тривалості серцевого циклу, оскільки втрата свідомості та раптова смерть можуть виникати не тільки при рідкісному вродженому, але й при більш частому набутому патологічному збільшенні тривалості цього інтервалу [1]. Розроблені робочі таблиці для розшифровки електрокардіограми з визначенням ступеня відхилення серця та розрахунку частоти серцевих скорочень за інтервалом R-R [2]. На основі нормативних показників розроблена автоматизована система ЕКГ-діагностики [3]. У кількох документах [4–6] використані терміни та класифікація ВООЗ з врахуванням досягнень останніх років для створення діагностичних алгоритмів та програм для машинної обробки електрокардіограм.

Незважаючи на широке використання електрокардіографічного методу за умов експерименту при фармакологічних та токсикологічних дослідженнях, сьогодні відсутні систематизовані дані щодо нормованих величин елементів ЕКГ для експериментальних тварин, що суттєво утруднює інтерпретацію отриманих даних та їх порівняльний аналіз. Наявні дослідження у цьому напрямі не піддавалися відповідному математичному та кореляційно-регресивному аналізу [7, 8]. Деякі автори при вивченні окремих фармакологічних засобів аналізували лише частину отриманих електрокардіографічних показників [9–14]. Серед вказаних авторів можна назвати окремих дослідників, які детально вивчали структуру ЕКГ у експериментальних тварин [15]. Особливо це стосується українських фізіологів та токсикологів [16, 17].

Отже, незважаючи на широке застосування білих щурів при проведенні доклінічних досліджень нових БАР, донині низка аспектів нормальної фізіології цих тварин вимагає уточнення, що певним чином утруднює інтерпретацію експериментальних матеріалів. Це, зокрема, стосується і електрофізіології серця.

### **Матеріали та методи**

Для створення таблиць нормованих величин структурних елементів ЕКГ статевозрілих щурів-самців були піддані кореляційно-регресивному аналізу ЕКГ понад 70 тварин. При цьому ми дотримувалися певних правил та вимог.



Електрофізіологічну активність серця реєструють за допомогою комп'ютерного електрокардіографічного комплексу «Пошук» або будь-яким іншим приладом, призначеним для цієї мети. Для фіксації щурів застосовують спеціальні гумові гамачки різних розмірів залежно від розмірів тварин, що мають п'ять отворів: чотири – для кінцівок та один в області проекції серця на грудну клітку для доступу до області серця для підшкірного введення електродів. Вказаний пристрій дає можливість безболісної та зручної фіксації тварин без застосування фармакологічних засобів та при мінімальному збудженні, гарантує безпечне проведення процедур під час експерименту, забезпечує якісну реєстрацію ЕКГ при фізіологічному положенні тіла тварин. При застосуванні цього пристрою та накладенні електродів ЕКГ на передню праву, задні кінцівки та в ділянці серця підшкірно реєструється максимально чітка ЕКГ, придатна для аналізу на комп'ютерному комплексі «Пошук» або на іншому відповідному приладі. Математична обробка експериментального матеріалу проводиться на персональній ЕОМ із застосуванням пакету програм [18–20].

Аналізу піддаються  $m$  (маса тіла, г),  $t$  (температура тіла, °С),  $dP$  (тривалість зубця Р, с),  $dPQ$  (тривалість інтервалу Р-Q, с),  $IM$  (індекс Макроуза – відношення тривалості зубця Р до тривалості інтервалу Р-Q, але не сегмента Р-Q!),  $dQRS$  (тривалість інтервалу QRS, с),  $dQRST$  (тривалість інтервалу QRST, с),  $dRR$  (тривалість серцевого циклу, с),  $CHSS$  (частота серцевих скорочень, уд./хв),  $SP$  (систолический показник – відношення тривалості інтервалу QRST до тривалості серцевого циклу R-R),  $AP$  (висота зубця Р, мВ),  $AR$  (висота зубця R, мВ),  $AT$  (висота зубця Т, мВ) та інші показники. Як відомо, зубець Р відображає збудження передсердь. Інтервал Р-Q реєструється від початку зубця Р, включаючи його ширину, до початку зубця Q. У щурів, як правило, у відведенні «права передня кінцівка – права задня кінцівка – проекція серця на грудну клітку» зубець Q не виявляється, отже реєструється інтервал Р-R. Цей інтервал віддзеркалює час, необхідний для деполяризації передсердь (зубець Р) та проведення імпульсу через атріовентрикулярне з'єднання, пучок Гіса та його гілки (період від кінця зубця Р до початку зубця Q (або зубця R при відсутності зубця Q)). Вважається, що інтервал Р-Q характеризує проходження імпульсу по найдовшій ділянці провідної системи серця [21, 22].

Для аналізу структури та динаміки змін ЕКГ здійснювали кореляційно-регресійний аналіз 19 різних емпіричних показників з визначенням коефіцієнтів кореляції та їх вірогідності, рівнянь регресії, їх типу та репрезентативності. Для цього використовували такі 4 математичні моделі залежності: лінійна ( $Y=a+bX$ ), степенева ( $Y=aX^b$ ), експоненційна (показова) ( $Y=\exp(a+bX)$ ) та обернена ( $1/Y=a+bX$ ). Як відомо, для більш точної оцінки генерального параметра Фішера [19] запропонував замінити коефіцієнт кореляції  $r$  перетвореною величиною  $z$ , яка пов'язана з емпіричним коефіцієнтом кореляції таким чином:

$$z = 1/2 \ln |(1+r)/(1-r)| \text{ або } z = 1,15129 \lg |(1+r)/(1-r)|$$

$$t_z = Z/S_r = Z\sqrt{n-3},$$

де  $t_z$  – нормоване відхилення чи критерій Стьюдента.

### **Нормовані величини структурних елементів ЕКГ статевозрілих щурів-самців. Кореляційно-регресивний аналіз експериментальних даних**

У табл.1 наведені результати кореляційно-регресивного аналізу тих пар структурних елементів ЕКГ щурів, для яких коефіцієнти кореляції були вірогідними ( $p < 0,05$ ), а математичні моделі, які відображають ці співвідношення, були репрезентативними.

Як видно з табл. 1, спостерігається пряма пропорційна залежність тривалості інтервалу Р-Q від тривалості серцевого циклу. Необхідно зазначити, що кардіологи виділяють ще 2 сегменти: сегмент Р-Q, який вимірюється від кінця зубця Р до початку зубця Q (не плутати з інтервалом Р-Q!), та сегмент S-T, який вимірюється від кінця зубця S до початку зубця Т. Зубець Q відображає деполяризацію міжплуночкової перетинки. Зубець R відображає деполяризацію верхівки, передньої, задньої та бокової стінок шлуночків серця. Тривалість ін-

Зведені результати кореляційно-регресивного аналізу основних структурних елементів ЕКГ інтактних статевозрілих щурів-самців

№	Пари показників	Коефіцієнт кореляції, $r$	Вільний член рівняння, $a$	Вірогідність, $P$	Кутовий коефіцієнт, $b$	Вірогідність, $P$	Математична модель
1	m-t	-0,4236	1307,65	0,0000	-28,803	0,0006	$y=1307,65-28,803x$
2	m-AP	0,2903	5,3958	0,0000	0,3163	0,0221	$y=e^{(5,3958+0,3163x)}$
3	m-AT	0,2522	5,3955	0,0000	0,2390	0,0480	$y=e^{(5,3955+0,2390x)}$
4	t-m	-0,4236	38,7286	0,0000	-0,0062	0,0006	$y=38,7286-0,0062x$
5	t-dRR	-0,3686	3,4434	0,0000	-0,0800	0,0032	$y=e^{3,4434x^{(-0,0800)}}$
6	t-CHSS	0,3908	34,0412	0,0000	0,0061	0,0017	$y=34,0412+0,0061x$
7	t-dPQ	-0,3479	3,5528	0,0000	-0,0170	0,0056	$y=e^{3,5528x^{(-0,0170)}}$
8	t-segPQ	-0,2940	3,5851	0,0000	-0,0063	0,0204	$y=e^{3,5851x^{(-0,0063)}}$
9	dP-IM	0,5561	-4,8748	0,0000	0,8883	0,0000	$y=e^{(-4,8748+0,8883x)}$
10	dP-dRR	0,4282	-0,0090	0,1733	0,2114	0,0005	$y=-0,0090+0,2114x$
11	dP-CHSS	-0,4194	0,0397	0,0000	-0,0000	0,0007	$y=0,0397-0,0000x$
12	dP-dQRST	0,2617	-2,9514	0,0000	0,4930	0,0399	$y=e^{-2,9514x^{0,4930}}$
13	dP-segPQ	0,3758	65,5259	0,0000	964,167	0,0026	$1/y=65,5259+964,167x$
14	dPQ-t	-0,3479	21,9271	0,0174	-7,1218	0,0056	$y=e^{21,9271x^{(-7,1218)}}$
15	dPQ-IM	-0,7106	0,0452	0,0000	-0,0319	0,0000	$y=0,0452-0,0319x$
16	dPQ-dQRST	-0,3553	0,0424	0,0000	-0,2690	0,0046	$y=0,0424-0,2690x$
17	dPQ-SP	-0,4213	0,0471	0,0000	-0,0377	0,0006	$y=0,0471-0,0377x$
18	dPQ-segPQ	0,8704	0,0162	0,0000	0,8292	0,0000	$y=0,0162+0,8292x$
19	dPQ-dTP	-0,3779	-3,6379	0,0000	-11,5152	0,0024	$y=e^{(-3,6379-11,5152x)}$
20	IM-dP	0,5297	2,4502	0,0001	0,6717	0,0000	$y=e^{2,4502x^{0,6717}}$
21	IM-dPQ	0,7855	-0,2846	0,1758	84,3271	0,0000	$1/y=-0,2846+84,3271x$
22	IM-dQ-T	-0,4642	4,3851	0,0000	-37,7353	0,0001	$1/y=4,3851-37,7353x$
23	IM-SP	-0,3926	4,0721	0,0000	-3,7763	0,0016	$1/y=4,0721-3,7763x$
24	IM-segPQ	0,9765	0,8498	0,0000	99,8735	0,0000	$1/y=0,8498+99,8735x$
25	IM-dTP	0,3563	0,6004	0,0000	5,9794	0,0045	$y=0,6004+5,9794x$
26	dQRS-dQ-T	-0,5600	189,741	0,0000	-1197,13	0,0000	$1/y=189,741-1197,13x$
27	dQRS-SP	-0,5880	198,468	0,0000	-148,72	0,0000	$1/y=198,468-148,72x$
28	dQRS-AP	0,4875	0,0092	0,0000	-0,0073	0,0000	$y=0,0092-0,0073x$
29	dQRS-AT	0,3860	0,0093	0,0000	0,0050	0,0019	$y=0,0093+0,0050x$
30	dQRS-segPQ	0,3255	95,6342	0,0000	875,426	0,0098	$1/y=95,6342+875,426x$
31	dQRS-dTP	-0,3219	-4,4867	0,0000	-6,7098	0,0107	$y=e^{(-4,4867-6,7098x)}$
32	dQ-T-IM	0,4496	-2,5551	0,0000	0,1883	0,0003	$y=e^{(-2,5551)x^{0,1883}}$
33	dQRST-dP	-0,2742	16,2233	0,0000	-144,979	0,0310	$1/y=16,2233-144,979x$
34	dQ-T-dPQ	0,3997	11,541	0,0000	110724	0,0013	$1/y=11,541+110,724x$
35	dQ-T-dRR	0,3772	-0,9231	0,0936	0,7827	0,0025	$y=e^{(-0,9231)x^{0,7827}}$
36	dQ-T-CHSS	0,3877	1,9454	0,6038	0,0227	0,0018	$1/y=1,9454+0,0227x$
37	dQ-T-dQRS	0,5509	-0,8984	0,0103	0,3763	0,0000	$y=e^{(-0,8984)x^{0,3763}}$
38	dQ-T-SP	0,8752	-2,209	0,0000	0,9407	0,0000	$y=e^{(-2,209)x^{0,9407}}$
39	dQ-T-segPQ	0,5176	12,9874	0,0000	136,614	0,0000	$1/y=12,9874+136,614x$
40	dQ-T-dTP	-0,4304	0,0804	0,0000	-0,4287	0,0005	$y=0,0804-0,4287x$
41	dRR-t	0,3912	-6,7973	0,1589	0,4209	0,0017	$y=-6,7973+0,4209x$
42	dRR-dP	0,4282	0,1002	0,0000	0,8674	0,0005	$y=0,1002+0,8674x$
43	dRR-dQRST	0,3772	-1,7040	0,0000	0,1818	0,0025	$y=e^{(-1,7040)x^{0,1818}}$
44	dRR-CHSS	-0,9994	4,0864	0,0000	-0,9989	0,0000	$y=e^{4,0864x^{(-0,9989)}}$
45	dRR-dTP	0,3828	0,1017	0,0000	0,3065	0,0021	$y=0,1077+0,3065x$
46	CHSS-t	0,3909	-406,97	0,1596	25,2188	0,0017	$y=-406,97x+25,2188$
47	CHSS-dP	0,4250	0,00167	0,0000	0,0144	0,0006	$1/y=0,00167+0,0144x$
48	CHSS-dQRST	-0,3811	5,7921	0,0000	-0,1838	0,0022	$y=e^{5,7921x^{(-0,1838)}}$
49	CHSS-dRR	0,9994	-0,0000	0,9842	0,0167	0,0000	$1/y=-0,0000+0,0167x$
50	CHSS-dTP	0,3863	0,0018	0,0000	0,0052	0,0019	$1/y=0,0018+0,0052x$

№	Пари показників	Коефіцієнт кореляції, $r$	Вільний член рівняння, $a$	Вірогідність, $P$	Кутовий коефіцієнт, $b$	Вірогідність, $P$	Математична модель
51	SP-dPQ	0,4474	1,2957	0,0000	12,6119	0,0003	$1/y=1,2957+12,6119x$
52	SP-dQRS	0,5772	1,2400	0,0001	0,3667	0,0000	$y=e^{1,2400x} \cdot 0,3667$
53	SP-dQRST	-0,8753	2,9442	0,0000	-18,6853	0,0000	$1/y=2,9442-18,6853x$
54	SP-AP	0,2787	0,6222	0,0000	0,1606	0,0282	$y=0,6222+0,1606x$
55	SP-segPQ	0,4708	1,4834	0,0000	12,6418	0,0001	$1/y=1,4834+12,6418x$
56	SP-dTP	-0,6512	0,7412	0,0000	-5,4817	0,0000	$y=0,7412-5,4817x$
57	AP-m	0,2902	-0,1218	0,2906	0,0011	0,0221	$y=-0,1218+0,0011x$
58	AP-dQRS	0,4875	-0,1903	0,0192	32,4039	0,0001	$y=-0,1903+32,4039x$
59	AP-SP	0,2787	-0,1694	0,2317	0,4836	0,0282	$y=-0,1694+0,4836x$
60	AP-AT	0,9193	-0,0094	0,4237	0,7999	0,0000	$y=-0,0094+0,7999x$
61	AP-dTP	-0,3371	0,2289	0,0000	-4,9238	0,0074	$y=0,2289-4,9238x$
62	AT-m	0,2520	-0,0738	0,5806	0,0011	0,0482	$y=-0,0738+0,0011x$
63	AT-dQRS	0,3860	-0,1129	0,2442	29,4886	0,0020	$y=-0,1129+29,4886x$
64	AT-AP	0,9193	-0,0394	0,0025	1,0565	0,0000	$y=-0,0394+1,0565x$
65	AT-dTP	-0,2825	0,2732	0,0000	-4,7426	0,0261	$y=0,2732-4,7426x$
66	segPQ-t	-0,2940	44,1385	0,0371	-13,637	0,0204	$y=e^{44,1385x} \cdot (-13,637)$
67	segPQ-dP	-0,3422	0,0181	0,0000	-0,6855	0,0065	$y=0,0181-0,6855x$
68	segPQ-dPQ	0,8704	-0,0129	0,0000	0,9136	0,0000	$y=-0,0129+0,9136x$
69	segPQ-IM	-0,9391	0,0391	0,0000	-0,0443	0,0000	$y=0,0391-0,0443x$
70	segPQ-dQRS	-0,2500	0,0171	0,0006	-0,9008	0,0500	$y=0,0171-0,9008x$
71	segPQ-dQRST	-0,4644	0,0348	0,0000	-0,3691	0,0001	$y=0,0348-0,3691x$
72	segPQ-SP	-0,4176	0,0332	0,0000	-0,0393	0,0007	$y=0,0332-0,0393x$
73	segPQ-dTP	0,4369	135,422	0,0000	5208,05	0,0004	$1/y=135,422+5208,05x$
74	dTP-dPQ	-0,3546	0,0282	0,0000	-0,4702	0,0047	$y=0,0282-0,4702x$
75	dTP-IM	0,3563	0,0025	0,6265	0,0212	0,0045	$y=0,0025+0,0212x$
76	dTP-dQRS	-0,3195	0,0325	0,0000	-1,4541	0,0114	$y=0,0325-1,4541x$
77	dTP-dQRST	-0,4483	-2,0549	0,0008	-30,5191	0,0003	$y=e^{(-2,0549-30,5191x)}$

тервалу P-Q прямо корелює з величиною тривалості серцевого циклу. Для кардіологів розроблені таблиці максимальної нормальної тривалості інтервалу P-Q при різній частоті серцевих скорочень.

Висота зубця R у щурів-самців у наших дослідженнях дорівнювала  $0,834 \pm 0,047$  см. Відстань від початку зубця Q до проекції вершини зубця R на ізоелектричну лінію отримала назву «часу внутрішнього відхилення» (інтервал Q-R). Цей показник має певне діагностичне значення, оскільки вважають, що він відображає час розповсюдження збудження від ендокарду до епікарду у ділянці розташування електрода і його застосовують для оцінки послідовності збудження шлуночків серця. Комплекс QRS вимірюється від початку зубця Q до кінця зубця S. У інтактних щурів-самців його тривалість дорівнювала  $0,01 \pm 0,0005$  с. Вказаний комплекс віддзеркалює процеси деполяризації шлуночків. Відстань від кінця комплексу QRS до початку зубця T отримала назву сегмента S-T, який характеризує період повільного згасання збудження шлуночків та початок повільної реполяризації. Вважають, що характер сегмента S-T (R-T) може мати у клініці суттєве діагностичне значення. Так, зміщення його вище ізоелектричної лінії може відбуватися при гострій ішемії чи інфаркті міокарда, аневризмі серця, при перикардитах, іноді при дифузних міокардитах, гіпертрофії шлуночків, а також у здорових осіб із синдромом ранньої реполяризації шлуночків. Зміщення сегмента S-T (R-T) вниз (горизонтальна депресія) може бути ознакою коронарної недостатності. Нисхідна депресія сегменту S-T (R-T), найбільш виражена у кінцевій його частині, може вказувати на гіпертрофію шлуночків та повну блокаду ніжок пучка Гіса. Зміщення цього сегмента у вигляді дуги, вигнутої вниз, може вказувати на гіпокаліємію при дигітальній інтоксикації, а висхідна депресія відповідно – при вираженій тахікардії.

Зубець Т відображає процес швидкої реполяризації шлуночків. Вважають, що зміни зубця Т не є специфічними. Зокрема збільшення його вольтажу спостерігається при ішемії міокарда, гіпертрофії лівого шлуночка, гіперкаліємії. Зменшення амплітуди зубця Т спостерігається при дистрофії міокарда, кардіоміопатіях, атеросклеротичному та постінфарктному кардіосклерозі, ексудативному перикардиті. Двофазні (інвертовані) зубці Т можуть бути при хронічній коронарній недостатності, інфаркті міокарда, гіпертрофії шлуночків, дистрофіях міокарда, міокардіопатіях, міокардиті, перикардиті, гіпокаліємії, порушеннях мозкового кровообігу. Вважають, що при встановленні змін зубця Т, їх необхідно співставити із змінами комплексу QRS та, відповідно, сегмента S-T. Сегмент Q-T (QRST) вимірюється від початку зубця Q (або R, якщо зубець Q відсутній) до кінця зубця Т і віддзеркалює електричну систолу шлуночків серця. Тривалість інтервалу Q-T (QRST) залежить від багатьох факторів, і перш за все від тривалості серцевого циклу. Для визначення нормованої тривалості інтервалу Q-T (QRST) клініцисти застосовують формулу Базетта:

$$Q-T = K \cdot \sqrt{R-R} ,$$

де R-R означає тривалість серцевого циклу, при цьому К для чоловіків дорівнював 0,37, а для жінок – 0,40, відповідно.

У клініці для співставлення тривалості цього інтервалу з тривалістю серцевого циклу використовується показник коригованого інтервалу (Q-T(k)), який визначається за формулою:

$$Q-T(k) = \frac{Q-T(k) \text{ емпіричний}}{\sqrt{R-R}} \quad [21].$$

Необхідно додати, що для клініцистів запропоновано низку таблиць, де наводяться мінімальні та максимальні величини тривалості інтервалу Q-T у нормі при різній частоті серцевих скорочень. Скорочення інтервалу Q-T (QRST) спостерігається при гіперкальціємії, інтоксикації препаратами наперстянки [23–26]. Подовження цього інтервалу може спостерігатися при гіпокальціємії, при дифузних ураженнях міокарда та центральної нервової системи. Існують дані літератури, які вказують, що інтервал Q-T (QRST) збільшується під впливом хінідину, кордарону, похідних фенотіазину, при отруєнні алкалоїдами та речовинами холіноміметичної дії. Рівняння регресії, наведені у табл. 1, були використані для розрахунку нормованих величин інтервалів dP, dP-Q, dQ-T (QRST) та dT-Q, тобто таких, які найбільш часто використовуються у експериментальних дослідженнях для оцінки характеру впливу БАР на серцево-судинну систему.

Далі наведені відповідні таблиці (2–5) для знаходження нормованих величин структурних елементів ЕКГ у щурів за відомою частотою серцевих скорочень.

Діастолічний інтервал T-P вимірюється від кінця зубця Т та до початку зубця Р і характеризує період спокою міокарда (діастола).

При функціональній діагностиці стану серцево-судинної системи за допомогою електрокардіографії при порушеннях структури ЕКГ суттєву увагу приділяють стану електролітного балансу, який виникає при багаторазовому блюванні, поносах, передозуваннях сечогінних препаратів, при цукровому діабеті, при тривалому застосуванні засобів, які пригнічують реабсорбцію калію (кортикостероїди), при хворобі Іценко-Кушінга та інших станах. Надлишок калію (ураження нирок із зниженням діурезу, при передозуваннях препаратів калію) проявляється високим загостреним зубцем Т, зменшенням інтервалу Q-T (QRST), суттєвим уповільненням атріовентрикулярної провідності, зменшенням амплітуди зубця Р, розширенням комплексу QRS, синусовою брадикардією, зплосненням та інверсією зубця Т, депресією сегменту S-T. Дефіцит кальцію проявляється подовженням інтервалу Q-T, зниженням вольтажу зубця Т та скороченням інтервалу P-Q. Надлишок кальцію скорочує інтервал Q-T та збільшує тривалість інтервалу P-Q [22–28].

Отже у інтактних статевозрілих щурів-самців отримано такі середні показники тривалості інтервалів ЕКГ (мс): dP – 15 (13,3% від тривалості серцевого циклу dR-R), dPQ – 23 (20,3%),

**Нормовані величини тривалості інтервалу dP (с) залежно від частоти  
серцевих скорочень у статевозрілих щурів-самців**

ЧСС, уд./хв	Треті знаки чисел									
	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9
200	0,0289	0,0289	0,0288	0,0288	0,0287	0,0287	0,0287	0,0286	0,0286	0,0285
210	0,0285	0,0285	0,0284	0,0284	0,0283	0,0283	0,0283	0,0282	0,0282	0,0281
220	0,0281	0,0281	0,028	0,028	0,0279	0,0279	0,0278	0,0278	0,0278	0,0277
230	0,0277	0,0276	0,0276	0,0276	0,0275	0,0275	0,0274	0,0274	0,0274	0,0273
240	0,0273	0,0272	0,0272	0,0272	0,0271	0,0271	0,027	0,027	0,027	0,0269
250	0,0269	0,0268	0,0268	0,0267	0,0267	0,0267	0,0266	0,0266	0,0265	0,0265
260	0,0265	0,0264	0,0264	0,0263	0,0263	0,0263	0,0262	0,0262	0,0261	0,0261
270	0,0261	0,026	0,026	0,0259	0,0259	0,0259	0,0258	0,0258	0,0257	0,0257
280	0,0256	0,0256	0,0256	0,0255	0,0255	0,0254	0,0254	0,0254	0,0253	0,0253
290	0,0252	0,0252	0,0252	0,0251	0,0251	0,025	0,025	0,025	0,0249	0,0249
300	0,0248	0,0248	0,0248	0,0247	0,0247	0,0246	0,0246	0,0245	0,0245	0,0245
310	0,0244	0,0244	0,0243	0,0243	0,0243	0,0242	0,0242	0,0241	0,0241	0,0241
320	0,024	0,024	0,0239	0,0239	0,0239	0,0238	0,0238	0,0237	0,0237	0,0237
330	0,0236	0,0236	0,0235	0,0235	0,0234	0,0234	0,0234	0,0233	0,0233	0,0232
340	0,0232	0,0232	0,0231	0,0231	0,0230	0,0230	0,0230	0,0229	0,0229	0,0228
350	0,0228	0,0228	0,0227	0,0227	0,0226	0,0226	0,0225	0,0225	0,0225	0,0224
360	0,0224	0,0223	0,0223	0,0223	0,0222	0,0222	0,0221	0,0221	0,0221	0,022
370	0,022	0,0219	0,0219	0,0219	0,0218	0,0218	0,0217	0,0217	0,0217	0,0216
380	0,0216	0,0215	0,0215	0,0214	0,0214	0,0214	0,0213	0,0213	0,0212	0,0212
390	0,0212	0,0211	0,0211	0,021	0,021	0,0210	0,0209	0,0209	0,0208	0,0208
400	0,0208	0,0207	0,0207	0,0206	0,0206	0,0206	0,0205	0,0205	0,0204	0,0204
410	0,0203	0,0203	0,0203	0,0202	0,0202	0,0201	0,0201	0,0201	0,02	0,02
420	0,0199	0,0199	0,0199	0,0198	0,0198	0,0197	0,0197	0,0197	0,0196	0,0196
430	0,0195	0,0195	0,0195	0,0194	0,0194	0,0193	0,0193	0,0192	0,0192	0,0192
440	0,0191	0,0191	0,019	0,019	0,019	0,0189	0,0189	0,0188	0,0188	0,0188
450	0,0187	0,0187	0,0186	0,0186	0,0186	0,0185	0,0185	0,0184	0,0184	0,0184
460	0,0183	0,0183	0,0182	0,0182	0,0181	0,0181	0,0181	0,018	0,018	0,0179
470	0,0179	0,0179	0,0178	0,0178	0,077	0,077	0,0177	0,076	0,0176	0,0175
480	0,0175	0,0175	0,0174	0,0174	0,0173	0,0173	0,0173	0,0172	0,0172	0,071
490	0,0171	0,017	0,017	0,017	0,0169	0,0169	0,0168	0,0168	0,0168	0,0167
500	0,0167	0,0166	0,0166	0,0166	0,0165	0,0165	0,0164	0,0164	0,0164	0,0163
510	0,0163	0,0162	0,0162	0,0162	0,0161	0,0161	0,016	0,016	0,0159	0,0159
520	0,0159	0,0158	0,0158	0,0157	0,0157	0,0157	0,0156	0,0156	0,0155	0,0155
530	0,0155	0,0154	0,0154	0,0153	0,0153	0,0153	0,0152	0,0152	0,0151	0,0151
540	0,0151	0,015	0,015	0,0149	0,0149	0,0148	0,0148	0,0148	0,0147	0,0147
550	0,0146	0,0146	0,0146	0,0145	0,0145	0,0144	0,0144	0,0144	0,0143	0,0143
560	0,0142	0,0142	0,0142	0,0141	0,0141	0,014	0,014	0,014	0,0139	0,0139
570	0,0138	0,0138	0,0137	0,0137	0,0137	0,0136	0,0136	0,0135	0,0135	0,0135
580	0,0134	0,0134	0,0133	0,0133	0,0133	0,0132	0,0132	0,0131	0,0131	0,0131
590	0,013	0,013	0,0129	0,0129	0,0129	0,0128	0,0128	0,0127	0,0127	0,0126
600	0,0126	0,0126	0,0125	0,0125	0,0124	0,0124	0,0124	0,0123	0,0123	0,0122
610	0,0122	0,0122	0,0121	0,0121	0,0120	0,0120	0,0120	0,0119	0,0119	0,0118
620	0,0118	0,0118	0,0117	0,0117	0,0116	0,0116	0,0115	0,0115	0,0115	0,0114
630	0,0114	0,0113	0,0113	0,0113	0,0112	0,0112	0,0111	0,0111	0,0111	0,0110
640	0,011	0,0109	0,0109	0,0109	0,0108	0,0108	0,0107	0,0107	0,0107	0,0106
650	0,0106	0,0105	0,0105	0,0104	0,0104	0,0104	0,0103	0,0103	0,0103	0,0102

Нормовані величини тривалості інтервалу  $dPQ$  (с) залежно від частоти серцевих скорочень у статевозрілих щурів-самців

ЧСС, уд/хв	Треті знаки чисел									
	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9
200	0,0335	0,0334	0,0334	0,0334	0,0333	0,0333	0,0333	0,0332	0,0332	0,0331
210	0,0331	0,0331	0,033	0,033	0,033	0,0329	0,0329	0,0328	0,0328	0,0328
220	0,0327	0,0327	0,0326	0,0326	0,0326	0,0325	0,0325	0,0325	0,0324	0,0324
230	0,0323	0,0323	0,0323	0,0322	0,0322	0,0321	0,0321	0,0321	0,032	0,032
240	0,032	0,0319	0,0319	0,0318	0,0318	0,0318	0,0317	0,0317	0,0317	0,0316
250	0,0316	0,0315	0,0315	0,0315	0,0314	0,0314	0,0313	0,0313	0,0313	0,0312
260	0,0312	0,0312	0,0311	0,0311	0,031	0,031	0,031	0,0309	0,0309	0,0309
270	0,0308	0,0308	0,0307	0,0307	0,0307	0,0306	0,0306	0,0305	0,0305	0,0305
280	0,0304	0,0304	0,0304	0,0303	0,0303	0,0302	0,0302	0,0302	0,0301	0,0301
290	0,0301	0,03	0,03	0,0299	0,0299	0,0299	0,0298	0,0298	0,0297	0,0297
300	0,0297	0,0296	0,0296	0,0296	0,0295	0,0295	0,0294	0,0294	0,0294	0,0293
310	0,0293	0,0293	0,0292	0,0292	0,0291	0,0291	0,0291	0,029	0,029	0,0289
320	0,0289	0,0289	0,0288	0,0288	0,0288	0,0287	0,0287	0,0286	0,0286	0,0286
330	0,0285	0,0285	0,0285	0,0284	0,0284	0,0283	0,0283	0,0283	0,0282	0,0282
340	0,0281	0,0281	0,0281	0,028	0,028	0,028	0,0279	0,0279	0,0278	0,0278
350	0,0278	0,0277	0,0277	0,0277	0,0276	0,0276	0,0275	0,0275	0,0275	0,0274
360	0,0274	0,0273	0,0273	0,0273	0,0272	0,0272	0,0272	0,0271	0,0271	0,027
370	0,027	0,027	0,0269	0,0269	0,0269	0,0268	0,0268	0,0267	0,0267	0,0267
380	0,0266	0,0266	0,0265	0,0265	0,0265	0,0264	0,0264	0,0264	0,0263	0,0263
390	0,0262	0,0262	0,0262	0,0261	0,0261	0,0261	0,026	0,026	0,0259	0,0259
400	0,0259	0,0258	0,0258	0,0257	0,0257	0,0257	0,0256	0,0256	0,0256	0,0255
410	0,0255	0,0254	0,0254	0,0254	0,0253	0,0253	0,0253	0,0252	0,0252	0,0251
420	0,0251	0,0251	0,025	0,025	0,0249	0,0249	0,0249	0,0248	0,0248	0,0248
430	0,0247	0,0247	0,0246	0,0246	0,0246	0,0245	0,0245	0,0245	0,0244	0,0244
440	0,0243	0,0243	0,0243	0,0242	0,0242	0,0241	0,0241	0,0241	0,024	0,024
450	0,024	0,0239	0,0239	0,0238	0,0238	0,0238	0,0237	0,0237	0,0237	0,0236
460	0,0236	0,0235	0,0235	0,0235	0,0234	0,0234	0,0233	0,0233	0,0233	0,0232
470	0,0232	0,0232	0,0231	0,0231	0,023	0,023	0,023	0,0229	0,0229	0,0229
480	0,0228	0,0228	0,0227	0,0227	0,0227	0,0226	0,0226	0,0225	0,0225	0,0225
490	0,0224	0,0224	0,0224	0,0223	0,0223	0,0222	0,0222	0,0222	0,0221	0,0221
500	0,0221	0,022	0,022	0,0219	0,0219	0,0219	0,0218	0,0218	0,0217	0,0217
510	0,0217	0,0216	0,0216	0,0216	0,0215	0,0215	0,0214	0,0214	0,0214	0,0213
520	0,0213	0,0213	0,0212	0,0212	0,0211	0,0211	0,0211	0,021	0,021	0,0209
530	0,0209	0,0209	0,0208	0,0208	0,0208	0,0207	0,0207	0,0206	0,0206	0,0206
540	0,0205	0,0205	0,0205	0,0204	0,0204	0,0203	0,0203	0,0203	0,0202	0,0202
550	0,0201	0,0201	0,0201	0,02	0,02	0,02	0,0199	0,0199	0,0198	0,0198
560	0,0198	0,0197	0,0197	0,0197	0,0196	0,0196	0,0195	0,0195	0,0195	0,0194
570	0,0194	0,0193	0,0193	0,0193	0,0192	0,0192	0,0192	0,0191	0,0191	0,019
580	0,019	0,019	0,0189	0,0189	0,0189	0,0188	0,0188	0,0187	0,0187	0,0187
590	0,0186	0,0186	0,0186	0,0185	0,0185	0,0184	0,0184	0,0184	0,0183	0,0183
600	0,0182	0,0182	0,0182	0,0181	0,0181	0,018	0,018	0,018	0,0179	0,0179
610	0,0179	0,0178	0,0178	0,0177	0,0177	0,0177	0,0176	0,0176	0,0176	0,0175
620	0,0175	0,0174	0,0174	0,0174	0,0173	0,0173	0,0172	0,0172	0,0172	0,0171
630	0,0171	0,0171	0,017	0,017	0,0169	0,0169	0,0169	0,0168	0,0168	0,0168
640	0,0167	0,0167	0,0166	0,0166	0,0166	0,0165	0,0165	0,0164	0,0164	0,0164
650	0,0163	0,0163	0,0163	0,0162	0,0162	0,0161	0,0161	0,0161	0,016	0,016

*Нормовані величини тривалості інтервалу Q-T (QRST) (с) у статевозрілих щурів-самців залежно від частоти серцевих скорочень*

ЧСС, уд./хв	Треті знаки чисел									
	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9
200	0,154	0,1535	0,1529	0,1524	0,1519	0,1514	0,1508	0,1503	0,1498	0,1493
210	0,1488	0,1483	0,1478	0,1473	0,1468	0,1463	0,1458	0,1454	0,1449	0,1444
220	0,1439	0,1435	0,143	0,1425	0,1421	0,1416	0,1412	0,1407	0,1403	0,1398
230	0,1394	0,1389	0,1385	0,1381	0,1376	0,1372	0,1368	0,1363	0,1359	0,1355
240	0,1351	0,1347	0,1343	0,1339	0,1335	0,133	0,1326	0,1322	0,1319	0,1315
250	0,1311	0,1307	0,1303	0,1299	0,1295	0,1291	0,1288	0,1284	0,128	0,1276
260	0,1273	0,1269	0,1265	0,1262	0,1258	0,1255	0,1251	0,1247	0,1244	0,124
270	0,1237	0,1233	0,123	0,1227	0,1223	0,122	0,1216	0,1213	0,121	0,1206
280	0,1203	0,12	0,1197	0,1193	0,119	0,1187	0,1184	0,118	0,1177	0,1174
290	0,1171	0,1168	0,1165	0,1162	0,1159	0,1156	0,1153	0,115	0,1147	0,1144
300	0,1141	0,1138	0,1135	0,1132	0,1129	0,1126	0,1123	0,112	0,1117	0,1115
310	0,1112	0,1109	0,1106	0,1103	0,1101	0,1098	0,1095	0,1093	0,109	0,1087
320	0,1084	0,1082	0,1079	0,1076	0,1074	0,1071	0,1069	0,1066	0,1063	0,1061
330	0,1058	0,1056	0,1053	0,1051	0,1048	0,1046	0,1043	0,1041	0,1038	0,1036
340	0,1033	0,1031	0,1029	0,1026	0,1024	0,1021	0,1019	0,1017	0,1014	0,1012
350	0,101	0,1007	0,1005	0,1003	0,1001	0,0998	0,0996	0,0994	0,0992	0,0989
360	0,0987	0,0985	0,0983	0,098	0,0978	0,0976	0,0974	0,0972	0,097	0,0968
370	0,0965	0,0963	0,0961	0,0959	0,0957	0,0955	0,0953	0,0951	0,0949	0,0947
380	0,0945	0,0943	0,0941	0,0939	0,0937	0,0935	0,0933	0,0931	0,0929	0,0927
390	0,0925	0,0923	0,0921	0,0919	0,0917	0,0915	0,0913	0,0911	0,091	0,0908
400	0,0906	0,0904	0,0902	0,09	0,0898	0,0897	0,0895	0,0893	0,0891	0,0889
410	0,0887	0,0886	0,0884	0,0882	0,088	0,0879	0,0877	0,0875	0,0873	0,0872
420	0,087	0,0868	0,0867	0,0865	0,0863	0,0861	0,086	0,0858	0,0856	0,0855
430	0,0853	0,0851	0,085	0,0848	0,0846	0,0845	0,0843	0,0842	0,084	0,0838
440	0,0837	0,0835	0,0834	0,0832	0,0831	0,0829	0,0827	0,0826	0,0824	0,0823
450	0,0821	0,082	0,0818	0,0817	0,0815	0,0814	0,0812	0,0811	0,0809	0,0808
460	0,0806	0,0805	0,0803	0,0802	0,08	0,0799	0,0797	0,0796	0,0794	0,0793
470	0,0792	0,079	0,0789	0,0787	0,0786	0,0785	0,0783	0,0782	0,078	0,0779
480	0,0778	0,0776	0,0775	0,0774	0,0772	0,0771	0,0769	0,0768	0,0767	0,0765
490	0,0764	0,0763	0,0761	0,076	0,0759	0,0758	0,0756	0,0755	0,0754	0,0752
500	0,0751	0,075	0,0749	0,0747	0,0746	0,0745	0,0743	0,0742	0,0741	0,074
510	0,0738	0,0737	0,0736	0,0735	0,0734	0,0732	0,0731	0,073	0,0729	0,0727
520	0,0726	0,0725	0,0724	0,0723	0,0722	0,072	0,0719	0,0718	0,0717	0,0716
530	0,0714	0,0713	0,0712	0,0711	0,071	0,0709	0,0708	0,0706	0,0705	0,0704
540	0,0703	0,0702	0,0701	0,07	0,0699	0,0697	0,0696	0,0695	0,0694	0,0693
550	0,0692	0,0691	0,069	0,0689	0,0688	0,0687	0,0686	0,0684	0,0683	0,0682
560	0,0681	0,068	0,0679	0,0678	0,0677	0,0676	0,0675	0,0674	0,0673	0,0672
570	0,0671	0,067	0,0669	0,0668	0,0667	0,0666	0,0665	0,0664	0,0663	0,0662
580	0,0661	0,066	0,0659	0,0658	0,0657	0,0656	0,0655	0,0654	0,0653	0,0652
590	0,0651	0,065	0,0649	0,0648	0,0647	0,0646	0,0645	0,0644	0,0643	0,0642
600	0,0642	0,0641	0,0640	0,0639	0,0638	0,0637	0,0636	0,0635	0,0634	0,0633
610	0,0632	0,0631	0,063	0,063	0,0629	0,0628	0,0627	0,0626	0,0625	0,0624
620	0,0623	0,0622	0,0622	0,0621	0,062	0,0619	0,0618	0,0617	0,0616	0,0615
630	0,0615	0,0614	0,0613	0,0612	0,0611	0,0610	0,061	0,0609	0,0608	0,0607
640	0,0606	0,0605	0,0604	0,0604	0,0603	0,0602	0,0601	0,06	0,06	0,0599
650	0,0598	0,0597	0,0596	0,0595	0,0595	0,0594	0,0593	0,0592	0,0591	0,0591

*Нормовані (очікувані) величини тривалості інтервалу T-P (діастола) (с) у інтактних статевозрілих щурів-самців залежно від частоти серцевих скорочень*

ЧСС, уд/хв	Треті знаки чисел									
	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9
200	0,0679	0,0667	0,0764	0,0657	0,0672	0,0671	0,0669	0,0667	0,0666	0,0664
210	0,0062	0,0661	0,0659	0,0657	0,0656	0,0654	0,0653	0,0651	0,0649	0,0648
220	0,0646	0,0644	0,0643	0,0641	0,0639	0,0638	0,0636	0,0635	0,0633	0,0631
230	0,063	0,0628	0,0626	0,0625	0,0623	0,0621	0,062	0,0618	0,0617	0,0615
240	0,0613	0,0612	0,061	0,0608	0,0607	0,0605	0,0603	0,0602	0,06	0,598
250	0,0597	0,0595	0,0594	0,0592	0,059	0,0589	0,0587	0,0585	0,0584	0,0582
260	0,058	0,0579	0,0577	0,0576	0,0574	0,0572	0,0571	0,0569	0,0567	0,0566
270	0,0564	0,0562	0,0561	0,0559	0,0557	0,0556	0,0554	0,0553	0,0551	0,0549
280	0,0548	0,0546	0,0544	0,0543	0,0541	0,0539	0,0538	0,0536	0,0535	0,0533
290	0,0531	0,053	0,0528	0,0526	0,0525	0,0523	0,0521	0,052	0,0518	0,0516
300	0,0515	0,0513	0,0512	0,051	0,0508	0,0507	0,0505	0,0503	0,0502	0,05
310	0,0498	0,0497	0,0495	0,0494	0,0492	0,049	0,0489	0,0487	0,0485	0,0484
320	0,0482	0,048	0,0479	0,0477	0,0476	0,0474	0,0472	0,0471	0,0469	0,0467
330	0,0466	0,0464	0,0462	0,0461	0,0459	0,0457	0,0456	0,0454	0,0453	0,0451
340	0,0449	0,0448	0,0446	0,0444	0,0443	0,0441	0,0439	0,0438	0,0436	0,0435
350	0,0433	0,0431	0,043	0,0428	0,0426	0,0425	0,0423	0,0421	0,042	0,0418
360	0,0416	0,0415	0,0413	0,0412	0,041	0,0408	0,0407	0,0405	0,0403	0,0402
370	0,04	0,0398	0,0397	0,0395	0,0394	0,0392	0,039	0,0389	0,0387	0,0385
380	0,0384	0,0382	0,038	0,0379	0,0377	0,0375	0,0374	0,0372	0,0371	0,0369
390	0,0367	0,0366	0,0364	0,0362	0,0361	0,0359	0,0357	0,0356	0,0354	0,0353
400	0,0351	0,0349	0,0348	0,0346	0,0344	0,0343	0,0341	0,0339	0,0338	0,0336
410	0,0334	0,0333	0,0331	0,033	0,0328	0,0326	0,0325	0,0323	0,0321	0,032
420	0,0318	0,0316	0,0315	0,0313	0,0312	0,031	0,0308	0,0307	0,0305	0,0303
430	0,0302	0,03	0,0298	0,0297	0,0295	0,0294	0,0292	0,029	0,0289	0,0287
440	0,0285	0,0284	0,0282	0,028	0,0279	0,0277	0,0275	0,0274	0,0272	0,0271
450	0,0269	0,0267	0,0266	0,0264	0,0262	0,0261	0,0259	0,0257	0,0256	0,0254
460	0,0253	0,0251	0,0249	0,0248	0,0246	0,0244	0,0243	0,0241	0,0239	0,0238
470	0,0236	0,0234	0,0233	0,0231	0,023	0,0228	0,0226	0,0225	0,0223	0,0221
480	0,022	0,0218	0,0216	0,0215	0,0213	0,0212	0,021	0,0208	0,0207	0,0205
490	0,0203	0,0202	0,02	0,0198	0,0197	0,0195	0,0193	0,0192	0,019	0,0189
500	0,0187	0,0185	0,0184	0,0182	0,018	0,0179	0,0177	0,0175	0,0174	0,0172
510	0,0171	0,0169	0,0167	0,0166	0,0164	0,0162	0,0161	0,0159	0,0157	0,0156
520	0,0154	0,0152	0,0151	0,0149	0,0148	0,0146	0,0144	0,0143	0,0141	0,0139
530	0,0138	0,0136	0,0134	0,0133	0,0131	0,013	0,0128	0,0126	0,0125	0,0123
540	0,0121	0,012	0,0118	0,0116	0,0115	0,0113	0,0112	0,011	0,0108	0,0107
550	0,0105	0,0103	0,0102	0,01	0,0098	0,0097	0,0095	0,0093	0,0092	0,009
560	0,0089	0,0087	0,0085	0,0084	0,0082	0,008	0,0079	0,0077	0,0075	0,0074
570	0,0072	0,0071	0,0069	0,0067	0,0066	0,0064	0,0062	0,0061	0,0059	0,0057
580	0,0056	0,0054	0,0052	0,0051	0,0049	0,0048	0,0046	0,0044	0,0043	0,0041
590	0,0039	0,0038	0,0036	0,0034	0,0033	0,0031	0,003	0,0028	0,0026	0,0025
600	0,0023	0,0021	0,002	0,0018	0,0016	0,0015	0,0013	0,0011	0,0009	0,0008

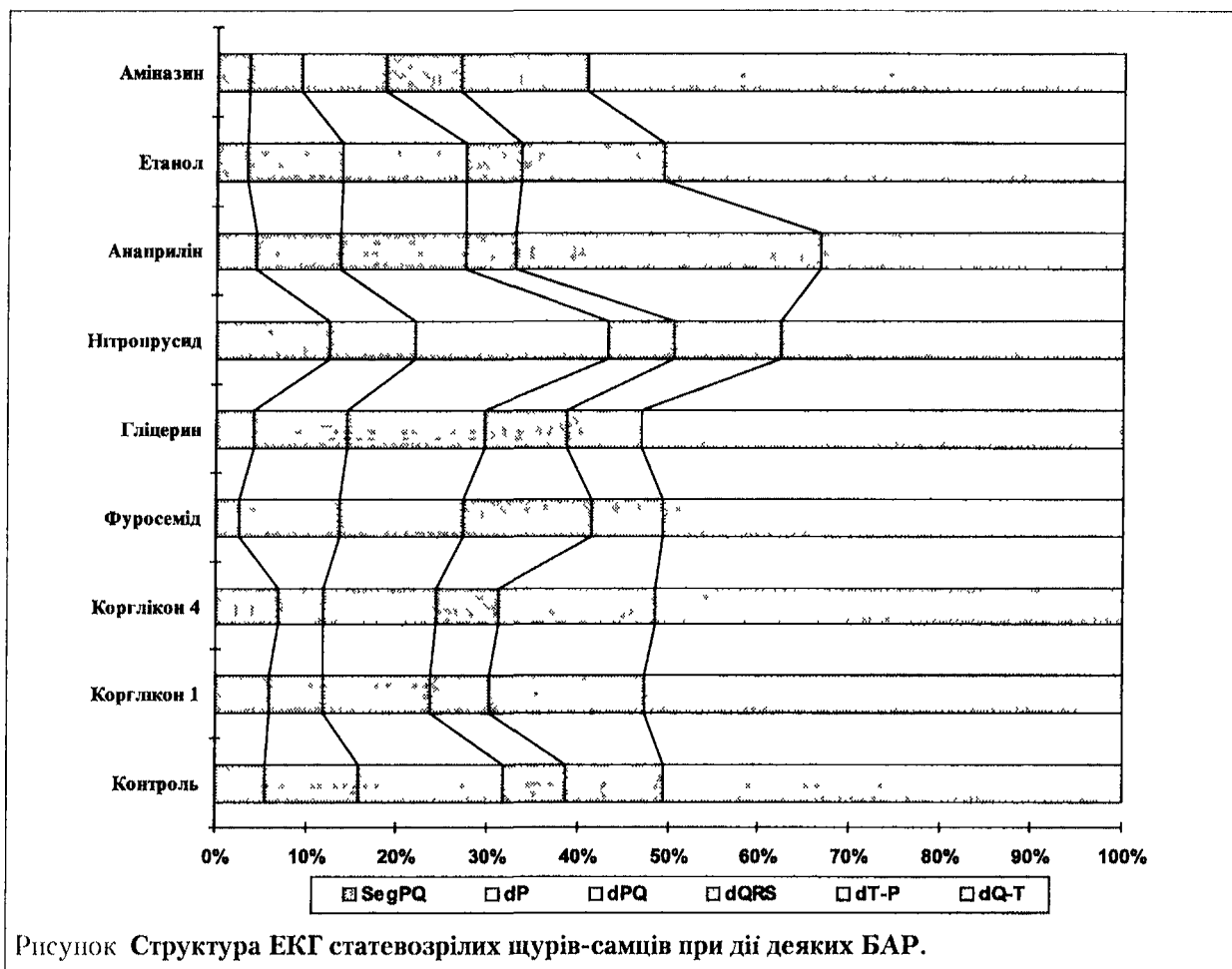


сегмент PQ – 8 (7,1%), dQRS – 10 (8,8%), dQ-T – 73 (64,6%), dTP – 18 (15,9%), відповідно. Тривалість серцевого циклу dR-R становила 113 мс (100%). Для порівняння можна зазначити, що тривалість інтервалу dQRST у людини знаходиться в межах від 465 до 240 мс і становить від 31,4% до 73,8% від тривалості серцевого циклу.

Як видно з наведених рівнянь регресії, залежність між показниками задовільно описувалася однією з чотирьох математичних моделей: лінійною, степеневою, експоненційною чи оберненою

### Характер зміни структури ЕКГ статевозрілих щурів-самців під впливом деяких БАР

Під впливом БАР структура ЕКГ суттєво змінювалася. Так, корглікон (2,5 мг/кг, в/м) через 1 год зменшував інтервали dP, dPQ, ЧСС та подовжував серцевий цикл і диастолу (dTP). Через 4 год вказані зміни залишалися і навіть дещо поглиблювалися. Фуросемід (15 мг/кг, в/м) через 4 год після введення вкорочував інтервал dPQ та сегмент dPQ. Гліцерин (9 мг/кг, 80% водний розчин, в/м) через 24 год подовжував інтервали dQRS та dQ-T і відповідно зменшував частоту серцевих скорочень (ЧСС). Нагірю нітропрусид (0,5 ЛД<sub>50</sub>, в/м) через 24 год подовжував інтервал PQ, сегмент PQ та серцевий цикл і зменшував ЧСС. Анаприлін (10 мг/кг, в/м) через 1 год вкорочував dQRST і зменшував ЧСС, але збільшував dRR та dTP. Етанол (10 мг/кг 400 розчину в/ш) через 30 хв відповідно не змінював жодного з названих показників. Аміназин (25 мг/кг, в/м) через 30 хв вкорочував інтервали dP, dPQ, сегмент dPQ і зменшував ЧСС і в той же час подовжував dQRS та dQ-T. Натрію ніприл (0,75 ЛД<sub>50</sub>, в/м) че-



рез 30 хв спричиняв суттєву деформацію структури серцевого циклу: вкорочував dP, dPQ та сегмент dPQ, зменшував ЧСС, але подовжував dRR та dTP. Графічна ілюстрація змін структури ЕКГ під впливом ряду БАР представлена на рисунку.

### Підсумки

Отже під впливом БАР, крім порушень тривалості інтервалів серцевого циклу, відбуваються різноманітні порушення координованості роботи серця, що проявлялися зміною показників кореляції між окремими елементами ЕКГ та, відповідно, зміною числових характеристик рівнянь регресії, що можна пояснити різними механізмами біологічної дії тих чи інших БАР. При цьому було встановлено, що в експериментальних тварин різні за механізмами дії БАР викликають притаманні тільки для них зміни кардіоритміки. Попередньо можна говорити, що БАР, які вивчались, впливають на процеси утворення електричного імпульсу, його провідність, а також контрактильність міокарда. Отже, існують передумови для вивчення цих процесів у експерименті на дрібних лабораторних тваринах за допомогою фармакологічних аналізаторів та відповідних приладів для ресстрації ЕКГ. Отримані результати дадуть можливість більш широкого використання методу електрокардіографії при доклінічному вивченню нових фармакологічних засобів. Запропоновані нормовані величини основних структурних елементів ЕКГ дадуть можливість прискорити опрацювання та інтерпретацію отриманих експериментальних матеріалів.

### Література

1. Постников А.Т. О методике определения и оценки нормальных величин интервала Q-T ЭКГ//Кардиол.– 1986.– Т.26.– С. 96–97.
2. Рабочие таблицы для расшифровки электрокардиограммы.– Алма-Ата: МЗ КазССР, 1990.– 5 с.
3. Шакин В.В. Вычислительная электрокардиография.– М.: Наука, 1981.– 167 с.
4. Унифицированные заключения по электрокардиографическим исследованиям (Методические рекомендации).– М.: IV Главное управление МЗ СССР, 1989.– 25 с.
5. Кечкер М.И. Электрокардиографические заключения и краткое описание изменений ЭКГ.– М.: Оверлей, 1993.– 95 с.
6. Система электрокардиографических заключений по нарушениям ритма и проводимости сердца (Методические рекомендации).– М.: МЗ СССР, 1981.– 28 с.
7. Платоенко В.И. Методические подходы к оценке состояния сердечно-сосудистой системы в эксперименте//Сб. научн. трудов «Гигиенические аспекты профилактики сердечно-сосудистой патологии при воздействии факторов окружающей и среды».– М., 1979.– С. 155- 157.
8. Говорунова Н.Н. Диаграмма для экспресс-анализа электрокардиограмм белых крыс//Гигиена и санит.– 1982.– №2.– С. 58.
9. Баскакова В.П., Кишишенева Е.Д., Пошкова В.П. Влияние  $\beta$ -блокатора обзидана на ЭКГ интактных и кастрированных животных//Тр. Крым. мед. ин-та.– 1983.– Т.95.– С. 7–9.
10. Говорунова Н.Н. О возможности использования строфантина при регистрации электрокардиограммы//Гигиена и санит.– 1988.– Т.10.– С. 56–59.
11. Маросанов С.Б. Влияние димедрола на особенности ЭКГ у кроликов в период сенситизации и во время разрешающих инъекций антигена//Пробл. патологии в эксперименте и клинике.– Львовс. мед. ин-т.– 1980.– Т.5.– С. 114–116.
12. Хисамутдинова Т.П. Экспериментальный анализ адренергических влияний на электрокардиограмму у собак//Физиол. журн.– 1980.– Т.26.– С. 83–87.
13. Hale S.L., Lehmann M.N., Kloner R.A. Electrocardiographic abnormalities after acute administration of cocaine in the rat//Am. J. Cardiol.– 1989.– V.63, №20.– P. 1529–1530.

14. Рябчук Ю.А., Коновалов А.И., Борило Г.А. Динамика ЭКГ-показателей у крыс в условиях комбинированного действия гипоксии и повышенной температуры//Механизмы адаптационных реакций организма.– Томск, 1987.– С. 74–81.
15. Воробьев Е.И. Радиационная кардиология.– М.: Атомиздат, 1971.– 272 с.
16. Западнюк И.П., Западнюк В.И., Захария Е.А. Лабораторные животные. Разведение, содержание, использование в эксперименте.– К., 1974.– 303 с.
17. Трахтенберг И.М., Сова Р.Е., Шефтель В.О., Оникисенко Ф.А. Проблема нормы в токсикологии.– М.: Медицина, 1991.– 205 с.
18. Григорьев С.Г., Левандовский В.В., Перфилов А.М., Юнкеров В.И. Пакет прикладных программ Statgraphics на персональном компьютере. Практическое пособие по обработке результатов медико-биологических исследований.– СПб., 1992.– 104 с.
19. Лакин Г.Ф. Биометрия.– М.: Высш. шк., 1981.– 294 с.
20. Зайцев Г.Н. Математическая статистика в экспериментальной ботанике.– М.: Наука, 1984.– 424 с.
21. Доцицин В.Л. Клинический анализ электрокардиограммы.– М.: Медицина, 1982.– 206 с.
22. Фролов В.А., Богданова Е.В., Казанская Т.А. Сердечный цикл.– М.: Изд-во МГУ, 1981.– 129 с.
23. Бобер С., Домбровская Б., Домбровский А. Практическая электрокардиография.– Варшава: Польск. мед. изд-во, 1974.– 282 с.
24. Дехтярь Г.Я. Электрокардиографическая диагностика.– М.: Медицина, 1972.– 416 с.
25. Грицюк А.И. Пособие по кардиологии.– К.: Здоров'я, 1984.– 556 с.
26. Сумароков А.В. Клиническая электрокардиография.– М.: Медицина, 1975.– 224 с.
27. Физиология и патофизиология сердца/Под ред. Н.Сперелакиса.– М.: Медицина, 1988.– Т.1.– 622 с.
28. Физиология и патофизиология сердца/Под ред. Н.Сперелакиса.– М.: Медицина, 1988.– Т.2.– 623 с.

## ДОКЛІНІЧНЕ ВИВЧЕННЯ АНТИАНЕМІЧНИХ ЗАСОБІВ, АНТИКОАГУЛЯНТІВ ТА ФІБРИНОЛІТИКІВ

Максимов Ю.М.,  
Лановенко І.І.

### 1. Доклінічне вивчення антианемічних засобів

#### 1.1. Класифікація та характеристика анемії

Анемія – патологічний процес, який характеризується зниженням кількості еритроцитів та вмісту гемоглобіну в одиниці об'єму крові, а також якісними змінами еритроцитів та гемоглобіну із відповідною клінічною симптоматикою.

За сучасною класифікацією анемії поділяються на три групи:

- постгеморагічні;
- гемолітичні;
- анемії внаслідок порушення гемопоєзу.

Залежно від механізмів формування анемії підходять до розподілу на:

- залізодефіцитні;
- залізопасичені (сідероахрестичні);
- В<sub>12</sub>- та фолієводефіцитні;
- анемії, обумовлені дією екзо- та ендоеритроцитарних гемолітичних факторів;
- гіпо-, мета- та апластичні.

Згідно з даними епідеміологічних та клініко-лабораторних досліджень, прихований дефіцит заліза та залізодефіцитні анемії широко розповсюджені у всьому світі, в тому числі й в Україні: 80% усіх анемії-є залізодефіцитними.

#### **Залізодефіцитні анемії.**

В основі їх розвитку лежать:

- гострі масивні та хронічні крововтрати;
- захворювання шлунково-кишкового тракту, інфекції; вагітність;
- аліментарна недостатність.

Залізодефіцитні анемії найчастіше обумовлені хронічною крововтратою з виснаженням запасів заліза в організмі. Добова потреба людини в залізі становить, у середньому, 1 мг (в 1 мл крові міститься 0,5 мг заліза). Щодобова втрата 8–15 мл крові здатна призводити до розвитку анемії.

Захворювання шлунково-кишкового тракту (ентерити, резекція шлунка та кишечника та ін.) та деякі хронічні інфекції призводять до порушення всмоктування заліза, обміну речовин і, як наслідок, – до формування анемії.

У вагітних і матерів-годувальниць анемія може виникнути внаслідок підвищення витрат заліза на потреби зростаючого плоду, крововтрати при пологах та ін.

Недостатнє надходження заліза з їжею також може зумовити розвиток анемії. Вони найчастіше зустрічаються в педіатричній практиці у зв'язку з неправильним вигодовуванням дитини.

Розрізняють 3 ступені тяжкості перебігу анемії:

- легка анемія (гемоглобін у межах 90–100 г/л, кількість еритроцитів – від 3,0 до 3,5 Т/л);
- анемія середньої тяжкості (гемоглобін – 70–90 г/л, кількість еритроцитів – 2,5–3,0 Т/л);
- тяжка анемія (гемоглобін менше 70 г/л, кількість еритроцитів – менше 2,5 Т/л).

### **Залізнасичені анемії**

Ці анемії обумовлені порушенням надходження заліза в еритроїдні клітини внаслідок спадкових або набутих дефектів ферментних систем і характеризуються високим вмістом заліза в крові.

### **$V_{12}$ - та фолієводефіцитні анемії**

Формуються внаслідок різкого зниження або відсутності вітаміну  $V_{12}$  та фолієвої кислоти – обов'язкових факторів еритропоезу.

### **Гемолітичні анемії**

Ці анемії виникають внаслідок підвищеного розпаду еритроцитів. При цьому тривалість життя еритроцитів різко скорочується – до 12–14 діб при нормі від 100 до 120 діб.

Підвищений гемоліз може бути переважно внутрішньоклітинним або внутрішньосудинним. При першому варіанті еритроцити розпадаються, головним чином, в селезінці з підвищенням вмісту в сироватці крові вільного білірубину. При другому варіанті в плазму крові надходить у великій кількості гемоглобін, який виділяється з сечею.

Гемолітичні анемії бувають спадковими та набутими. Велику клінічну значущість мають набути анемії. Вони виникають внаслідок появи протиеритроцитарних антитіл, механічного пошкодження оболонки еритроцитів («маршева» гемолітична анемія, протези клапанів серця та ін.), токсичного ушкодження хімічними сполуками (гемолітичні отрути, тяжкі метали, тощо).

### **Гіпопластичні, метапластичні та апластичні анемії**

Вони зумовлені функціональною недостатністю кісткового мозку, яка виникає внаслідок дії іонізуючої радіації, хімічних агентів (бензол, тетраетилсвинець, цитостатики, сульфаніламиди тощо), вірусної інфекції (вірусний гепатит), при лейкозах, мієломатозі та ін. Механізм їх формування – порушення синтезу ДНК, що призводить до пригнічення проліферації клітин кісткового мозку.

## **1.2. Моделювання анемії**

### **Залізодефіцитна анемія**

Звичайно в експерименті залізодефіцитні анемії створюють шляхом гострих, підгострих та хронічних крововтрат.

Моделі з використанням гострих та підгострих крововтрат придатні для скринінгових досліджень, тобто для встановлення наявності у речовини чи субстанції лікувальних або профілактичних властивостей. При цих моделях анемія розвивається швидко, але також швидко відбувається нормалізація відповідних показників червоної крові. У зв'язку з цим для вивчення специфічної активності лікарської форми вони неспридатні.

### **Гостра постгеморагічна анемія**

Досліди проводять на кролях породи Шиншила з масою тіла 2,5–3,0 кг.

Відбір крові здійснюють з крайової вени або артерії вуха в кількості 20% від об'єму циркулюючої крові (10 мл/кг маси тіла) [1].

Досліджувану речовину вводять одразу після крововтрати щодобово протягом 5 діб. Показники визначають у вихідному стані, а потім на 1, 3, 5 та 10-у добу після крововтрати.

Ці дослідження можна проводити також і на білих щурах лінії Вістар з масою тіла 180–230 г (кров вилучають у кількості 20 мл/кг, тобто 2 мл/100 г маси тіла).

Якщо речовина або субстанція виявили антианемічні властивості, то надалі дослідження проводять на моделі з підгострою крововтратою.

### **Підгостра постгеморагічна анемія**

Досліди проводять на кролях породи Шиншила з масою тіла 2,5–3,0 кг.

Роблять 5 крововилучень з вени або артерії вуха, кожен в об'ємі 10 мл/кг маси тіла протягом 8–9 діб.

Досліджувану речовину в різних дозах вводять через 1 добу протягом 10–15 діб.

Показники визначають у вихідному стані, на піку розвитку анемії (через 1 добу після останнього крововиливу), а потім на 6, 10, 15 та 20 добу відновного періоду.

### **Моделювання анемії за допомогою дефероксаміну (десфералу)**

Залізодефіцитну анемію можна викликати за допомогою деяких фармакологічних засобів, наприклад, дефероксаміну [2, 3]. Цей препарат здатен створювати комплексну сполуку із залізом, сприяє вилученню заліза з деяких залізовмісних білків (феритин, гемосидерин), але не з гемоглобіну та залізовмісних ферментів.

Досліди проводять на білих щурах лінії Вістар з масою тіла 180–220 г. Дефероксамін вводять у дозі 20% ЛД<sub>50</sub> (18,4 мг/100 г маси тіла) внутрішньоочеревинно щодоби протягом 9 діб.

Досліджувану речовину (субстанцію) вводять, починаючи з другої доби після початку введення дефероксаміну, протягом 13 діб. Показники вивчають у вихідному стані, потім на висоті розвитку анемії (1 доба після останнього введення дефероксаміну), а також на 6, 10 та 15 добу відновного періоду.

Використанням лише дефероксаміну не завжди вдасться отримати тривалу та достатньо виражену анемію. В зв'язку з цим доцільніше застосовувати комбіновану модель: введення дефероксаміну + крововилучення.

Досліди проводять на білих щурах лінії Вістар з масою тіла 180–220 г. Крововилучення роблять з вени хвоста в об'ємі 1% від маси тіла через 1 добу протягом 9 діб. Дефероксамін вводять внутрішньоочеревинно в дозі 18,4 мг/100 г маси тіла (20% ЛД<sub>50</sub>) щодоби протягом 9 діб.

Досліджувану речовину вводять, починаючи з другої доби після першого крововилучення та введення дефероксаміну, щодоби протягом 10–15 діб. Показники визначають у вихідному стані, на висоті розвитку анемії (1 доба після останнього введення дефероксаміну та крововтрати), а потім на 6, 10 та 15 добу відновного періоду.

Якщо на будь-якій з наведених моделей встановлена наявність антианемічних властивостей, тоді починають вивчення специфічної активності лікарської форми препарату (або субстанції) на моделі хронічної залізодефіцитної анемії.

### **Хронічна постгеморагічна анемія**

Досліди виконують на кролях, але принустимо використання білих щурів лінії Вістар з масою тіла 180–230 г.

Кров відбирають з вени хвоста в кількості 10% від об'єму циркулюючої крові щоденно протягом 4 тижнів. Досліджуваний препарат вводять, починаючи з 14 доби після початку крововиливу, протягом 15–20 діб. Показники визначають у вихідному стані, на висоті розвитку анемії (1 доба після останнього взяття крові), а потім на 6, 10 та 20 добу відновного періоду.

Однак, і при такій постановці досліду у тварин після завершення крововтрат може відбуватись швидка нормалізація показників червоної крові, що не дозволить достатньо об'єктивно оцінити антианемічні властивості досліджуваного препарату. Тому Державним фармакологічним центром МОЗ України запропонована більш жорстка модель хронічної постгеморагічної анемії у білих щурів.

Як і в наведеному вище варіанті, протягом 4 тижнів щодня робляться крововилучення – 10% від об'єму циркулюючої крові, а потім необхідний рівень анемії підтримуються крововилученнями – 5% від об'єму циркулюючої крові через день протягом 10–15 діб. Досліджувана лікарська форма препарату вводиться через 1 добу після завершення щоденних крововилучень (на 29-у добу) щодня до нормалізації або значного поліпшення показників. Останні визначають у вихідному стані, через 28 діб після щоденних крововтрат, а потім на 10, 15 та 29 добу після початку крововилучень в об'ємі 5%.

#### **Гемолітична анемія**

Зазвичай моделюється за допомогою фенілгідазину [4, 5]. Дослідження проводять на білих щурах лінії Вістар з масою тіла 200–260 г. Фенілгідазин вводять внутрішньом'язово щоденно протягом 4 діб у дозі 20 мг/кг маси тіла. На 1–3 добу після закінчення введення фенілгідазину формується нормохромна анемія.

Досліджувану лікарську форму препарату вводять протягом 1–2 тижнів щодня, починаючи з другої доби після першої ін'єкції фенілгідазину. Показники визначають у вихідному стані, на 5 добу після початку введення фенілгідазину, а потім через 5, 10 та 15 діб.

#### **Гіпопластична анемія**

Гіпопластичну анемію можна моделювати за допомогою опромінення та введення хімічних агентів.

##### **– Анемія, викликана опроміненням**

Досліди виконують на білих щурах лінії Вістар з масою тіла 210–250 г. Доза опромінення дорівнює 600 Р. При використанні апарату РУМ-17 пропонуються такі параметри опромінення:  $V = 190$  кВ,  $I = 10$  мА, поле – 40 x 40 см, потужність дози – 50,7 Р/хв, доза, поглинена м'якими тканинами, дорівнює 6,2 Гр.

Анемія починає формуватись з 5 доби, і на 15 добу концентрація гемоглобіну знижується до 50–55% від вихідного рівня. Досліджувана лікарська форма препарату вводиться щодоби протягом 2–3 тижнів, починаючи з 5-ї доби після опромінення. Показники визначають у вихідному стані, а потім на 10, 15 та 20-у добу після опромінення.

##### **– Анемія, викликана бензолом**

Моделюється на кролях, білих щурах і мишах [6–8]. У дослідах на мишах з масою тіла 22–26 г бензол вводять підшкірно щодоби в дозі 1–2 мл/кг протягом 10–12 діб. Для кролів доза бензолу становить 1 мл/кг (вводять підшкірно щодоби протягом 2 тижнів), для щурів – від 0,2 мл/кг (підшкірно щодоби протягом 4 тижнів) до 1,0 мл/кг (через добу впродовж 4 тижнів).

Виразена анемізація реєструється після 10-го введення бензолу і простежується протягом тривалого часу після завершення введень (понад 8 тижнів). Досліджуваний лікарський препарат або речовину вводять одразу після останньої ін'єкції бензолу протягом 3–4 тижнів. Досліджувані показники визначають у вихідному стані, на висоті розвитку анемії, а потім на 10, 20, 30 добу відновного періоду.

Визначення антианемічної активності розроблюваного препарату проводять у порівнянні з відомими лікарськими засобами цього класу (феролекс, ферокаль, фербітол, ферамід, ферум-лек та ін.). Вибір препарату порівняння обумовлюється особливостями діючої речовини, а також складом допоміжних інгредієнтів. Препарат порівняння вводиться у середньотерапевтичній дозі в такі ж самі строки, що і досліджувана лікарська форма розроблюваного препарату.

### ***1.3. Показники характеру та ступеню вираженості анемії, які пропонуються для вивчення***

1. Кількість еритроцитів в периферичній крові (загальноприйняті методи).
2. Кількість ретикулоцитів у периферичній крові (суправітальне фарбування мазків крові діаманткрезилловим синім).

3. Концентрація гемоглобіну в крові (фотоелектроколориметричний метод).
4. Кольоровий показник крові.
5. Гематокрит (за допомогою гематокритних капілярів).
6. Вміст заліза у сироватці крові (за допомогою набору Біо-Ла-Тест, інші біохімічні методи).
7. Загальна залізов'язуюча властивість сироватки крові (біохімічний метод).
8. Кістково-мозкове кровотворення (еритробластограми). Взяття кісткового мозку здійснюється з грудини, потім тонкі мазки на склі фарбуються за Папенгеймом. Вивчення еритробластограм проводять за методом [9].

## 2. Доклінічне вивчення нових антикоагулянтів

До групи антикоагулянтів відносять засоби, які перешкоджають або значно знижують зсідання крові. За напрямком дії розрізняють «прямі» та «непрямі» антикоагулянти.

«Прямі» антикоагулянти виявляють свою специфічну активність практично одразу після їх внутрішньовенного введення або внесення у пробірку з кров'ю. Механізм їх дії зумовлений пригніченням активності відповідного ферменту системи зсідання крові або порушеннями перетворення неактивного ензиму в активний. Класичним представником прямих антикоагулянтів є гепарин. Разом з тим, для виявлення дії гепарину необхідна наявність у крові достатньої кількості антитромбіну III (під час дисемінованого внутрішньосудинного згортання крові вміст цього білку різко знижується). Окрім того, його використання лімітується наявністю лише ін'єкційної форми та нетривалістю ефекту (особливо у вигляді натрієвої солі), що диктує необхідність пошуку нових антикоагулянтів прямої дії.

«Непрямі» антикоагулянти виявляють свою активність не одразу, а через декілька годин, оскільки механізм їх дії зумовлений порушенням синтезу прокоагулянтів. До «непрямих» антикоагулянтів відносять похідні 4-оксикумарину (синкумар, нітрофарин та ін.) та феніліндантіону (фенілін, омефін та ін.). Головні недоліки антикоагулянтів непрямой дії – відносно висока токсичність, значний за часом латентний період, відсутність ін'єкційних форм та ін.

### 2.1. Антикоагулянти прямої дії

Спочатку наявність у досліджуваної речовини антизгортувальної активності визначають за умов *in vitro*. Якщо внесення різних концентрацій речовини в плазму крові людини або тварини в тесті рекальцифікації супроводжується збільшенням часу згортання, тоді вона підлягає подальшому дослідженню. Зокрема, необхідно встановити, чи має речовина антикоагулянтні властивості щодо цільної крові. Для цього в пробірку вносять різні концентрації речовини і додають кров до постійного об'єму (з урахуванням розведення), а потім при кімнатній температурі (21–22°C) реєструють час спонтанного зсідання крові та порівнюють його з контролем.

Якщо у цих скринінгових дослідах речовина виявляє антикоагулянтні властивості, тоді переходять до досліджень *in vivo*. Досліджуваний агент після встановлення гострої токсичності вводять експериментальним тваринам (собаки, кролі, щури) внутрішньовенно в дозах 0,1 ЛД<sub>50</sub> та нижчих. Потім в різні проміжки часу реєструють час згортання крові у силіконових (або звичайних) пробірках і порівнюють його з вихідними даними.

У разі позитивного ефекту переходять до поглиблених досліджень речовини в експерименті на одному з видів тварин.

Після внутрішньовенного введення речовини вивчають наступні показники:

- тривалість кровотечі;
- час спонтанного зсідання крові;
- кількість тромбоцитів;
- агрегація тромбоцитів;
- час рекальцифікації плазми;



- активований парціальний тромбoplastиновий час;
- протромбіновий час;
- тромбіновий час;
- вміст фібриногену;
- фібринолітична активність цільної крові.

Окрім цих біохімічних показників, необхідно вивчати параметри тромбоеластограми. Паралельно з цим встановлюють  $ED_{50}$  речовини (найменша її кількість, яка вдвічі підвищує тривалість інтервалу «R» або «K» тромбоеластограми).

Перелічені вище тести вивчають у динаміці, що дає можливість встановити тривалість дії речовини.

Дослідження щодо характеристики антикоагулянтної активності речовини у повному обсязі можна провести лише в експерименті на собаках.

Дослідження припустимо проводити на кролях та білих щурах з вивченням 1–2 показників, які дозволяють судити про I, II, III фази зсідання крові та фібринолізу.

Наведені вище тести дають можливість встановити головний механізм дії антикоагулянта (антитромбoplastиновий, антитромбіновий, змішаний та ін.). Якщо у процесі проведення експерименту у речовини виявлено наявність комплексоутворюючих властивостей, а її антикоагулянтна активність обумовлена зв'язуванням іонів кальцію, тоді доцільно вивчати можливість її використання як реактиву або стабілізатора для консервування крові та її препаратів.

Якщо механізм незгорткування крові не обумовлений зв'язуванням іонів кальцію, тоді проводять порівняльні дослідження з гепарином з метою виявлення антикоагулянтної потужності речовини. Обов'язково вивчають дію речовини при внутрішньом'язовому, підшкірному та пероральному введеннях. Якщо за будь-яким параметром (у тому числі, за вартістю та доступністю сировини) досліджувана речовина не поступається гепарину або переважає його, тоді вона підлягає подальшим дослідженням.

Досліджують речовину на моделі тромбоемболічного стану.

З цієї метою білим щурам лінії Вістар з масою тіла 150–180 г внутрішньовенно вводять розчин тромбoplastину в такій концентрації, яка б призводила до появи бокового положення у 100% тварин з подальшою загибеллю 50% з них. Такі самі експерименти можна проводити і з внутрішньовенним введенням розчинів тромбіну.

Потім дослідним тваринам (не менше 10 осіб) профілактично (наприклад, за 15 та 30 хв, 1 та 6 год до введення тромбоемболічного агенту) вводять досліджувану речовину у вену хвоста і шляхом порівняння з показниками контролю (введення тромбoplastину або тромбіну) визначають наявність захисних властивостей. Такі ж досліди проводять і для виявлення терапевтичної активності речовини.

Дослідник може використовувати інші моделі, які дозволяють створювати гіперкоагуляційні та тромбоемболічні стани.

Якщо за допомогою наведених вище моделей у досліджуваної речовини виявлено наявність значної антикоагулянтної активності, тоді продовжують її вивчення у відповідності до вимог Державного фармакологічного центру МОЗ України.

Специфічна активність лікарської форми речовини (препарат) досліджується лише за найбільш інформативними показниками, в тому числі і на моделі тромбоемболічного стану.

## **2.2. Антикоагулянти непрямої дії**

На відміну від прямих антикоагулянтів, речовини непрямої антикоагулянтної дії вивчають тільки за умов *in vivo*.

Досліди виконують на різних видах тварин (не менше двох, наприклад, щури та собаки або кролі та собаки) після попереднього вивчення гострої токсичності речовини. Досліджуваний агент вводять тваринам перорально (внутрішньоплунково) або внутрішньом'язово (якщо ре-

човина розчинна у воді) в дозах 0,1 ЛД<sub>50</sub> та менших. Кров для досліджень беруть через 6, 12, 18, 24, 36 год і більше (при необхідності) після одноразового введення речовини. Кров стабілізують натрію цитратом (1:9) та після центрифугування вивчають:

- час рекальцифікації плазми;
- протромбіновий індекс;
- тромбіновий час;
- вміст фібриногену.

У цільній нестабілізованій крові визначають кількість тромбоцитів, показники тромбоеластограми (в першу чергу, параметри «R» і «K»).

Якщо за допомогою вказаних вище показників речовина виявляє антикоагулянтні властивості, тоді встановлюють переважний характер механізму дії. Якщо він зумовлений порушеннями синтезу протромбіну, тоді проводять порівняльні дослідження з одним з фармакологічних препаратів – антагоністів вітаміну К. Визначають ЕД<sub>50</sub> речовини та препарату порівняння (наприклад, знаходять дозу, яка викликає подовження протромбінового часу вдвічі) і вирішують доцільність подальших досліджень. Якщо речовина в цьому плані є перспективною, тоді вивчають її профілактичну дію на моделі тромбоемболічного стану (див. розд. «Антикоагулянти прямої дії»). Речовину вводять у різних дозах до використання тромбoplastину або тромбіну (строки введення визначають за тривалістю дії речовини, яка виявлена на попередньому етапі досліджень).

Потім переходять до вивчення речовини згідно з вимогами Державного фармакологічного центру МОЗ України. Специфічну активність лікарської форми препарату досліджують шляхом використання найбільш інформативних показників (наприклад, протромбінового індексу), а також на моделі претромботичного або тромботичного стану.

Нові прямі та непрямі антикоагулянти з нетрадиційним механізмом дії можуть бути впроваджені в медичну практику лише за наявності відповідних антагоністів. Наприклад, антагоністом гепарину та гепариноїдів є протаміну сульфат, непрямих антикоагулянтів – вітамін К.

За відсутності інгібіторів нових антикоагулянтів з неспецифічним механізмом дії неможливо коригувати стани, обумовлені порушенням згортання крові внаслідок передозування препарату.

Антагоністи антикоагулянтів повинні виявляти свій ефект протягом нетривалого часу (хвилини – у випадку прямого та перші кілька годин – у випадку непрямого антикоагулянту) при внутрішньовенному, внутрішньом'язовому та пероральному введеннях.

### 3. Доклінічне вивчення фібринолітиків

Фібринолітичні препарати, що існують нині, здійснюють свій ефект за рахунок прямого або опосередкованого впливу на тромб (фібринолізин, стрептокіназа, стрептодеказа, целіаза та ін.). Фібринолізин (плазмін) має здатність розчинювати ниті фібрину як за умов *in vivo*, так і *in vitro*; інші препарати каталізують перетворення плазміногену у плазмін та утворюють комплекс стрептокіназа-плазміноген, який виявляє протеолітичну активність.

Наведені вище препарати не забезпечують необхідною мірою потреби клініки внаслідок їх дорожечі та недостатньої специфічної активності, до того ж вони ефективні лише при «свіжих» тромбах (12–24 год).

Все це свідчить про необхідність пошуку фібринолітичних засобів нового покоління.

Вивчення потенційних фібринолітиків починають за умов *in vitro*. Речовина повинна добре розчинятися в дистильованій воді або фізіологічному розчині натрію хлориду. Різні кількості речовини вносять у систему для визначення спонтанного фібринолізу (будь-який метод) або у кювету тромбоеластографа з постановкою відповідних контролів. Таким чином встановлюють факт наявності або відсутності фібринолітичної активності. Негативні результати не є підставою для категоричного висновку щодо відсутності у речовини фібринолітичних власти-

востей. Зробити такий висновок дають можливість лише дослідження *in vivo* (оскільки ефект може носити опосередкований характер).

У дослідях на тваринах (кролі, собаки, білі щури) після попереднього визначення гострої токсичності вводять (внутрішньовенно, внутрішньом'язово, перорально) досліджувану речовину в дозах 0,1 ЛД<sub>50</sub> та менших. Через різні проміжки часу (30 хв – 12 год) досліджують фібринолітичну активність цільної крові (перевага надається методу [10]). За наявності у речовини фібринолітичної активності вивчають параметри зсідання крові після її одноразового введення (у різні проміжки часу). Досліджують час згортання крові, рекальцифікації плазми, тромбіновий час, визначають протромбіновий індекс, вміст фібриногену, фібрину, проводять тромбоеластографію.

Якщо при цьому не виявляється негативний вплив речовини на показники коагулограми, переходять до вивчення механізму фібринолітичної дії. З цією метою досліджують вплив речовини після її введення в організм тварин за допомогою різних методів (фібринові пластини, суглобуліновий метод, метод Бідуел та ін.), які дозволяють міркувати, на який саме ланцюг фібринолітичної системи вона діє.

Після цього проводять дослідження у порівнянні з дією препарату-стандарту. Наприклад, якщо фібриноліз зумовлений активацією проактиваторів плазміну по типу стрептокінази, тоді за допомогою тромбоеластографа за умов *in vitro* порівнюють ефект досліджуваної речовини з таким стрептокінази [11] і роблять висновок щодо доцільності подальшого вивчення цієї речовини.

На останньому етапі досліджують речовину на будь-якій моделі локального тромбозу судин – механічного, хімічного, електротравматичного тощо [12]. В разі отримання позитивного результату переходять до поглибленого вивчення речовини в рамках загальних вимог Державного фармакологічного центру МОЗ України.

Дослідження специфічної активності лікарської форми препарату проводять шляхом вивчення найбільш інформативних показників стану фібринолізу (експерименти на тваринах), а також на моделі локального тромбозу судин.

## Література

1. Лановенко И.И.//Докл. АН УССР.– Сер. Б.– 1990.– №10.– С. 60–63.
2. Голубева Л.И., Гулый М.Ф. и др.//Пробл. гематол. и перелив. крови.– 1981.– №6.– С. 19– 23.
3. Дегтярь Н.И.//Физиология и патол. перекисл. окисл. липидов, гемостаза и иммуногенеза.– Полтава, 1992.– С. 67–68.
4. Арипов М.А.//Вопр. фармакол. и фармации.– 1976.– Вып. 4.– С. 3–5.
5. Дударев В.П.//Физиол. журн.– 1968.– Т.234, №2.– С. 67–74.
6. Захарія Л.А., Сакун Т.Л.//Фармац. журн.– 1978.– №1.– С. 89–91.
7. Лишкан Г.Н.//II съезд гематол. и трансфузиол. Украины: Тез докл.– К., 1986.– Т.2.– С. 84–85.
8. Escorcía E.V., Lezama R.V., Torres A.M. et al. Anemia aplastica: Modelo para su induccion can benceno por via oral y subcutanea en rates//Sangre.– 1997.– V.42, №5.– P. 357–362.
9. Абрамов М.Г. Костный мозг. Цитологический метод.– М., 1970.– С. 342–358.
10. Котовщикова М.А., Кузник Б.И.//Лабор. дело.– 1962.– №5.– С. 23–32.
11. Пелькис П.С., Шевченко Л.И., Лозинский М.О. и др. Синтетические ингибиторы фибринолиза.– К.: Наук. думка, 1986.– 172 с
12. Хилькин А.М., Светлов В.А. Моделирование поражений сердца и сосудов в эксперименте.– М.: Медицина, 1979.– 376 с.

## ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНЕ (ДОКЛІНІЧНЕ) ВИВЧЕННЯ ФАРМАКОЛОГІЧНИХ РЕЧОВИН, ЯКІ ПРОПОНУЮТЬСЯ ЯК НЕСТЕРОЇДНІ ПРОТИЗАПАЛЬНІ ЗАСОБИ

Дроговоз С.М.,  
Зупанець І.А.,  
Мохорт М.А.,  
Яковлєва Л.В.,  
Клебанов Б.М.

Запалення – це складна, комплексна реакція організму у відповідь на ураження тканин різноманітними патогенними подразниками.

Будь-яке пошкодження тканин, незалежно від причин, що його викликали, може призвести до запалення. Але перебіг запального процесу, наприклад, бактеріального і алергічного, значно відрізняється одне від одного. Та, незважаючи на особливості запальних реакцій, для їх патогенезу характерні три фази: альтеративна, ексудативна, проліферативна, які, у свою чергу, визначають особливості їх фармакологічної корекції.

Роботи М.Д.Машковського, Г.Я.Шварца, Р.Д.Сюбаєва, В.О.Насонової, Ф.П.Тринуса, М.А.Мохорта, Б.М.Клебанова, Я.А.Сигідіна, С.М.Дроговоз та понад 20-річний досвід пошуку ефективних протизапальних засобів на кафедрі фармакології Української фармацевтичної академії і в Інституті фармакології та токсикології АМН України стали основою для написання даних методичних рекомендацій.

### 1. Обґрунтування оптимізації пошуку та вивчення нових протизапальних засобів нестероїдної структури

Сучасні погляди на ексудативні та проліферативні процеси в осередку запалення як такі, що визначають результат запальної реакції, зумовлюють пошук лікарських засобів, здатних регулювати вказані процеси. Для більшості нестероїдних протизапальних препаратів, що використовуються практичними закладами охорони здоров'я, в основному характерна вказана активність. Меншою мірою або взагалі вони не попереджають розвиток альтеративних процесів в осередку запалення, а також виявляють багато побічних ефектів, що є суттєвим недоліком в їх дії.

Зважаючи на вищезазначене, уявляється доцільним подальший пошук нових нестероїдних протизапальних препаратів проводити цілеспрямовано, з урахуванням їх спроможності до вибіркового впливу на ту чи іншу фазу запалення.

Безумовно, нові нестероїдні протизапальні препарати повинні мати велику широту терапевтичної дії, бути більш ефективними, ніж існуючі сьогодні, виявляти терапевтичну дію як при гострому, так і при хронічному запаленні, мати різноманітні (у тому числі «непростагландинні») механізми дії, створюватися на основі наявної вітчизняної сировини, бути технологічними у виробництві і доступними широкому колу населення.

Сучасні нестероїдні протизапальні засоби (НПЗЗ): індометацин, диклофенак-натрій, піроксикам, бутадіон, ацетилсаліцилова кислота та ін., за рахунок основного механізму дії – інгібування біосинтезу простагландинів (ПГ), спроможності виражено пригнічувати ексудацію і пролі-

Таблиця 1

Фармакологічна характеристика найбільш активних НПЗЗ, які рекомендуються як еталонні препарати

Нестероїдні протизапальні засоби	Вплив на фазу запалення		Вплив на ад'ювантний артрит, DE <sub>50</sub> , мг/кг	Анальгетична активність на моделі "одтрово-кислик корчів", DE <sub>50</sub> , мг/кг	Жарознижуюча дія на моделі пірогеналової лихманки (DE <sub>50</sub> мг/кг за зниженням температури тіла на 1 °С)	Гостра токсичність, DL <sub>50</sub> , мг/кг		Ульцерогенна дія, DU <sub>50</sub> , мг/кг	
	ексудацію на моделі каренінового набряку, DE <sub>50</sub> , мг/кг	альтеративного асептичного запалення шкіри, викликаного оцтовою кислотою, активність у %				проліферацію на моделі "ватної гранульоми", активність у %*	Миші		Щури
Індометацин	3,9	0	42	11	9	30	47	10	
Диклофенак-натрій	3,8	28	16	5	5	370	350	48	
Піроксикам	1,8	0	54	92	5	360	272	36	
Бутадіон	56	0	40	120	44	260	430	120	

При складанні цієї таблиці використовувались власні дані, а також дані проф. Я.А. Сигідина, проф. Г.Я. Шварца [9].

\* Речовини вивчалися у дозах, які викликають максимальний антипроліферативний ефект (індометацин – 10, диклофенак-натрій – 8, піроксикам – 12, бутадіон – 56 мг/кг).

ферацію, певним чином впливають на методичні підходи і принципи в пошуку нових НПЗЗ.

У таблиці 1 наведено коротку характеристику найбільш активних НПЗЗ: індометацину, диклофенаку-натрію, піроксикаму та бутадіону, з якої видно, що ці препарати пригнічують ексудацію, гіпертермію, практично не впливають (або погіршують) протікання альтеративного запального процесу, зменшують утворення грануляційної тканини, є ненаркотичними анальгетиками. Проте всі вони виявляють виражену ульцерогенну, гепатотоксичну дію, несприятливо впливають на процеси метаболізму у міокарді, суглобовому хрящі, сприяють бронхоспазму [16]. Ці прояви дії НПЗЗ, як позитивні, так і негативні, є наслідком їх основного механізму дії – впливу на ПГ.

Підходи до пошуку та вивчення нових НПЗЗ базуються на знаннях сучасних аспектів патогенезу запалення, що дозволяє шукати речовини, які пригнічують медіатори гострої фази запалення: біогенні аміни, продукти метаболізму арахідонової кислоти, кініни, протеолітичні ферменти. Викликають інтерес сполуки, які вибірково пригнічують продукти ліпоксигеназного шляху перетворення арахідонової кислоти, що сприяє зменшенню побічних ефектів препаратів. Перспективним є створення НПЗЗ з імуномодулюючою і хондропротекторною дією.

## 2. Скринінгові дослідження нових нестероїдних протизапальних засобів

У процесі пошуку нових НПЗЗ класичним підходом є вивчення антиексудативних властивостей сполук. На цей час розроблено багато моделей гострого асептичного запалення з вираженою фазою ексудації. У цьому переліку є ряд моделей, для яких вивчено їх патогенез, що дозволяє визначити механізм антиексудативної дії нових фармакологічно активних сполук. Згідно з вищенаведеним пошук сучасних НПЗЗ, інгібіторів метаболізму арахідонової кислоти доцільно проводити у двох напрямках:

- інгібітори циклооксигенази;
- інгібітори ліпоксигенази.

### 2.1. Пошук НПЗЗ-інгібіторів циклооксигенази

Для відтворення гострого асептичного запалення у лабораторних тварин (щури, миші) викорис-

товують різноманітні флогогени: карагенін, формалін, декстран, серотонін, гістамін, трипсин, овальбумін, агар, каолін [14].

У процесі пошуку інгібіторів циклооксигенази (ЦОГ) на скринінговому етапі вивчення антиексудативних властивостей рекомендується використовувати з флогогенів карагенін [18], а з лабораторних тварин – білих мишей масою 17–22 г. Досліджувані речовини вводять перорально (внутрішньоочередово) за 1 годину до субплантарного введення 0,05 мл 1% розчину карагеніну [17]. Через 3 години тварин виводять з досліду (з обов'язковим виконанням існуючих методичних прийомів), на рівні тазостегнових суглобів ампутують набряклі і ненабряклі задні стопи. Активність досліджуваних речовин визначають за їх здатністю зменшувати розвиток набряку в порівнянні з контролем і виражають у відсотках, які показують, наскільки дана речовина пригнічує розвиток карагенінового набряку по відношенню до контролю, де величина набряку приймається за 100%. Активність сполук, які вивчаються, розраховується за формулою:

$$A = 100 \% - \frac{(M_{\text{ид}} - M_{\text{зд}}) \cdot 100}{M_{\text{нк}} - M_{\text{эк}}}$$

де  $A$  – антиексудативна активність, %;

$M_{\text{ид}}$  – маса набряклої стопи в досліді;

$M_{\text{зд}}$  – маса здорової стопи в досліді;

$M_{\text{нк}}$  – маса набряклої стопи в контролі;

$M_{\text{эк}}$  – маса здорової стопи в контролі.

В усіх випадках маса стопи виражається в мг.

У разі відсутності карагеніну можна використовувати 10% суспензію каоліну. Однак ця модель є досить тривалою (6–8 діб), що ускладнює дослідження. Речовини треба вводити щодня. Стандартними препаратами можуть слугувати індометацин, вольтарен, піроксикам.

### 2.2. Пошук НПЗЗ-інгібіторів ліпоксигенази

Як було зазначено у розділі 1, при тривалому застосуванні сучасних НПЗЗ – інгібіторів ЦОГ серед перелічених негативних властивостей найчастіше виявляються порушення трофіки слизової оболонки шлунка. Внаслідок порушення нормальної мікроциркуляції слизової оболонки розвиваються ерозивні зміни, які супроводжуються спастичними болями та диспепсичними проявами. Механізм цієї побічної дії НПЗЗ пов'язаний з порушенням метаболізму арахідонової кислоти в бік підсилення утворення лейкотрієнів – продуктів її ліпоксигеназного перетворення. Згідно з сучасними уявленнями простагландини групи E забезпечують мікроциркуляцію слизової оболонки, тим самим покращують трофіку, у той час як лейкотрієни відносять до агресивних факторів.

У зв'язку з цим одним з найбільш сучасних підходів при проведенні скринінгу є пошук речовин-інгібіторів ліпоксигеназного шляху перетворення арахідонової кислоти.

Для досягнення цієї мети розроблено декілька тестів. K.Gado і G.Gigler (1991) [19] запропонували використовувати асептичне ексудативне запалення у щурів, викликане зимозаном. Зимозан – структурний полісахарид, який міститься у клітинах оболонки дріжджів, специфічно сприяє утворенню та виділенню лейкотрієнів і провокує локальну гостру запальну реакцію. На ранній стадії інгібітори ліпоксигенази попереджують зимозан-індукований набряк, а інгібітори ЦОГ недостатньо пригнічують реакцію. Зимозан вводять субплантарно з розрахунку 0,1 мл на тварину у вигляді 2% суспензії. Об'єм стоп вимірюють до і через 0,5; 1, 2 і 3 години після введення флогогену. Максимальний набряк розвивається через 30 хвилин. Як модельну речовину можна рекомендувати інгібітор ліпоксигенази – нордигідрогваяретову кислоту в дозі 400 мг/кг.

На цій моделі виражену антиексудативну дію виявляють також антигістамінові та антисеротонінові засоби, які можна віддиференціювати на моделях гістамінового та серотонінового набряків.

Зіставлення протизапальної активності речовин на моделях карагенінового та зимозанового набряків дозволяє визначити механізм антиексудативної дії. Інгібітори ЦОГ активні на моделі карагенінового набряку і слабо пригнічують зимозанове запалення, а інгібітори ліпоксигенази – навпаки. Інгібітори ліпази, такі, як дексаметазон, пригнічують обидва види запалення.

Друга модель запропонована J.P.Van Wanwe, J.G.Goossens (1989) [20] і модифікована в ЦНДЛ Національної фармацевтичної академії України. Мишам масою 26–30 г внутрішньовенно (у хвостову вену) вводять декстран Т-500 з розрахунку 60 мг/мл в об'ємі 0,1 мл на 10 г маси тіла. Одночасно в цьому ж розчині вводять синій Еванса у вигляді 0,25% розчину. Досліджувані речовини вводять внутрішньощлунково за 1 годину до введення флогогену. Декстран призводить до підвищення проникливості судин, що прискорює вихід барвника в міжклітинний простір. Найбільш інтенсивне забарвлення спостерігається на судинах вуха. Максимальне забарвлення спостерігається через 60–90 хв. Через 90 хв мишей виводять з досліду за допомогою ефірної камери, обрізають вуха, подрібнюють їх позиціями і заливають сумішшю ацетону (4,2 мл) і 0,5% розчину сульфату натрію (1,8 мл). Об'єми розчинів вказано на одну пробу. Екстракцію барвника проводять протягом доби при кімнатній температурі. Потім проби центрифугують при 3000–4000 об./хв протягом 10 хвилин. Інтенсивність забарвлення визначають спектрофотометрично на СФ-46 при довжині хвилі 620 нм. Відсоток інгібування набряку за ступенем зменшення забарвлення розраховують за формулою:

$$\left(1 - \frac{E_d - E_6}{E_k - E_6}\right) \cdot 100, \text{ де}$$

$E_d$  – екстинкція проби дослідних тварин (лікована патологія);

$E_6$  – екстинкція проби тварин, яким вводили тільки барвник;

$E_k$  – екстинкція проби контрольних тварин (нелікована патологія).

Вивчення фармакологічної активності кількох доз речовини дозволяє розраховувати ізоєфективні дози ( $DE_{50}$ ).

Установлено, що медіаторами цього запалення є кініни, серотонін і продукти ліпоксигеназного метаболізму арахідонової кислоти. Пригнічують розвиток забарвлення і речовини з антисеротоніною, антибрадикініною дією, а також подвійні інгібітори ліпоксигенази і циклооксигенази. Специфічні інгібітори циклооксигенази на описаній моделі активності не виявляють. Паралельне використання брадикінінового, серотонінового і карагенінового набряків дозволяє диференціювати механізм протизапальної дії [13].

### 2.3. Вибір доз для скринінгових досліджень

У процесі проведення скринінгу речовин на протизапальну активність одним з важко вирішуваних питань є вибір інтервалу доз. Дані різних авторів, які описують підходи пошуку біологічно активних речовин [11, 15], а також наш досвід вказує, що ідеальним варіантом є широке дослідження фармакологічної дії, починаючи з 0,1 мг/кг і збільшуючи дозу в геометричній прогресії з коефіцієнтом 3, тобто 0,3; 0,9; 2,7; 9; 27; 81; 243; 729; 2187 мг/кг і т.д. за необхідністю. У дозах вище 27 мг/кг фармакологічна ефективність не являє практичного інтересу, проте такий підхід дозволить виявити одночасно інтервал токсичних і летальних доз, що полегшує визначення  $DL_{50}$ .

Для реалізації такого підходу необхідні дуже великі матеріальні затрати. Це на практиці привело нас до деякого спрощення вибору доз для скринінгу. Основним критерієм кількісної характеристики фармакологічного ефекту є ізоєфективні дози, але як допоміжні можуть використовуватися і еквімолекулярні.

Визначення ізоєфективних доз для скринінгових досліджень є обов'язковим.

Фармакологічну активність групи нових сполук, які не мають аналога за структурою серед стандартних препаратів, необхідно вивчати в 3–4-х дозах: 0,1; 1,0; 5,0; 20,0 мг/кг з подальшим

розрахунком  $DE_{30}$ ,  $DE_{40}$  або  $DE_{50}$ . Нові сполуки, які є аналогами за структурою одного з відомих НПЗЗ (стандартних препаратів), доцільно вивчати в дозах, еквімолекулярних  $DE_{50}$  стандартного препарату, а потім для ефективних сполук розширити діапазон доз в інтервалі, близькому до еквімолекулярної дози, з метою розрахунку  $DE_{50}$ . При іншому підході можна випустити сполуки, які ефективні у діапазоні малих доз.

### 2.4. Вивчення антиексудативних властивостей

Для уточнення механізму антиексудативної дії речовини як флогогени можна використовувати 2% розчин формаліну (викликає деструкцію мембранних білків), 6% розчин декстрану (сприяє вивільненню біогенних амінів гістаміну та серотоніну), 0,5% розчин серотоніну, 0,1–0,5% розчин гістаміну, 0,25% розчин трипсину, 0,3% розчин гіалуронідази.

Якщо у мишей доцільно набряклість стопи визначати зважуванням після ампутації, то у щурів краще проводити механічне вимірювання об'єму стопи у динаміці за А.С. Захаревським [5] або за допомогою онкометра.

Для найперспективніших речовин, що виявляють антиексудативну дію, необхідно вивчити наявність антипроліферативних та антиальтеративних властивостей.

### 2.5. Вивчення антипроліферативних властивостей

У щурів масою 160–180 г, які перебувають під легким ефірним наркозом, на спині депілюють ділянку шкіри і в асептичних умовах ножицями роблять поздовжній розріз шкіри і підшкірної клітковини довжиною 1,5 см, формують порожнину, куди вміщують стерильну ватну кульку масою 15–20 мг, після чого на рану накладають 1–2 шви. На 8 добу досліду імплантовану кульку із утвореною навколо неї грануляційною тканиною виймають, висушують до постійної ваги при 55–60°C і вагу утвореної грануляційно-фіброзної тканини визначають за різницею між масою висушеної гранульоми та імплантованої ватної кульки. Речовини вводять щоденно в дозі  $DE_{30}$  –  $DE_{50}$ , яку визначено при гострому ексудативному запаленні. За необхідності дози збільшують (але не більше, ніж до 25 мг/кг) з метою визначення  $DE_{30}$  –  $DE_{50}$  у даному тесті.

Антипроліферативну дію перспективних речовин можна вивчати також за методикою «кишенькової гранульоми». Щурів підшкірно в міжлопаткову ділянку вводять шприцом 20 см<sup>3</sup> повітря. В утворений повітряний мішок вводять 0,5 мл 50% олійного розчину скипидару. Досліджувані речовини вводять в  $DE_{30}$  або  $DE_{50}$ , визначеній при ексудативній фазі запалення. На 8 добу тварин декапітують, гранульомний мішок відсенаровують, зважують, висушують до постійної маси і визначають масу повторно. Дана постановка досліду дозволяє оцінити також антиексудативну дію препарату (за різницею у масі гранульомного мішка до і після висушування).

### 2.6. Вивчення антиальтеративної дії

Даний етап дослідження передбачає первинне вивчення речовин з метою виявлення у них антиальтеративних властивостей. Існує кілька моделей альтеративного запалення.

1. Асептичне запалення у щурів, викликане підшкірним введенням 0,5 мл 9% водного розчину оцтової кислоти з одночасним внутрішньоочеревинним введенням 6% розчину декстрану (300 мг/кг). Недоліком моделі є неоднорідність виразок, які утворилися за їх вихідною площею, і неодночасність досягнення максимальної величини поверхні рани (7–10 доба). Перевагою моделі є можливість швидко оцінити цитопротекторну дію речовин, які вивчаються.

2. Стандартні шкірні рани діаметром 5–10 мм та глибиною скарифікованої рани від 1,5 до 5 мм формуються спеціально виготовленим пристроєм – скарифікатором. Під гексеналовим наркозом, в асептичних умовах на попередньо депільованій поверхні наноситься стандартно-



го діаметру і глибини шкірна рана шляхом обертання до щільно притиснутої шкіри скарифікаційного пристрою. Перевагою цього методу є стандартні умови формування ран.

Крім того, вивчення антиальтеративної активності НПЗЗ може бути проведене на моделі лінійних ран, методом формування запалення на шкірі шляхом введення в неї сечовини з одночасним внутрішньоочеревинним введенням серотоніну [13].

Для оцінки антиальтеративної активності можуть бути застосовані такі показники: площа рани ( $\text{мм}^2$ ) – вимірюють планіметрично протягом 1–25 днів. За цим параметром розраховується % активності речовин, які вивчаються, відносно нелікованих тварин. Швидкість загоєння ран доцільно розраховувати за формулою [2]:

$$V = 100 \cdot \frac{S_0 - S_t}{S_0},$$

де  $S_0$  – початкова площа рани (у разі оцтових виразок 4–7-й день),  $\text{мм}^2$ ;

$S_t$  – площа рани в день вимірювання  $t$ ,  $\text{мм}^2$ .

Показник швидкості загоєння ран є відносним і дає можливість характеризувати динаміку перебігу ранового процесу незалежно від різниці величини площі ран у окремих тварин.

Необхідно також ураховувати % загибелі тварин у контрольній і дослідній групах, а також час повного рубцювання.

Як еталонний препарат можна використовувати мефенамову кислоту, що виявляє виражену ранозагоюючу активність [15], або вольтарен (диклофенак-натрій, ортофен).

Вивчення антиальтеративної активності доцільно проводити на щурах.

Поряд з вивченням протизапальних властивостей при скринінгових дослідженнях визначають гостру токсичність перспективних сполук при тому ж шляху введення, при якому встановлена їх фармакологічна активність.

З метою економії часу, лабораторних тварин і досліджуваних речовин, перевага віддається використанню експрес-методу для визначення  $DL_{50}$  фармакологічно активних сполук [9], з наступним розширенням цих досліджень після вибору препарату для поглиблених доклінічних випробувань.

При проведенні скринінгових досліджень необхідно звертати увагу на стан слизової оболонки шлунка експериментальних тварин, а також спостерігати вплив різних доз досліджуваних речовин при тривалості їх уведення від 1 до 25 днів.

Результати цих спостережень дозволяють виявити сполуки з ульцерогенною активністю, що є додатковою інформацією для встановлення механізму антиексудативної дії речовин: інгібітори ЦОГ виявляють ушкоджуючу дію на слизову оболонку шлунка, а інгібітори ліпоксигенази ульцерогенної дії не виявляють.

Після завершення скринінгових досліджень вибір субстанції для розробки нового препарату необхідно проводити з урахуванням таких положень:

– якщо речовина є аналогом відомих НПЗЗ за механізмом дії, то вона повинна перевершувати найбільш ефективні з них за ефективністю та широтою терапевтичної дії;

– якщо є припущення, що речовина має нетрадиційний механізм дії, то перспективною буде речовина з мінімальною ефективною дозою (не вище 20 мг/кг) і максимальною широтою терапевтичної дії;

– відсутність ульцерогенної дії;

– доступність субстанції:

1) наявність вітчизняних вихідних речовин;

2) малостадійний синтез, який не вимагає особливих умов;

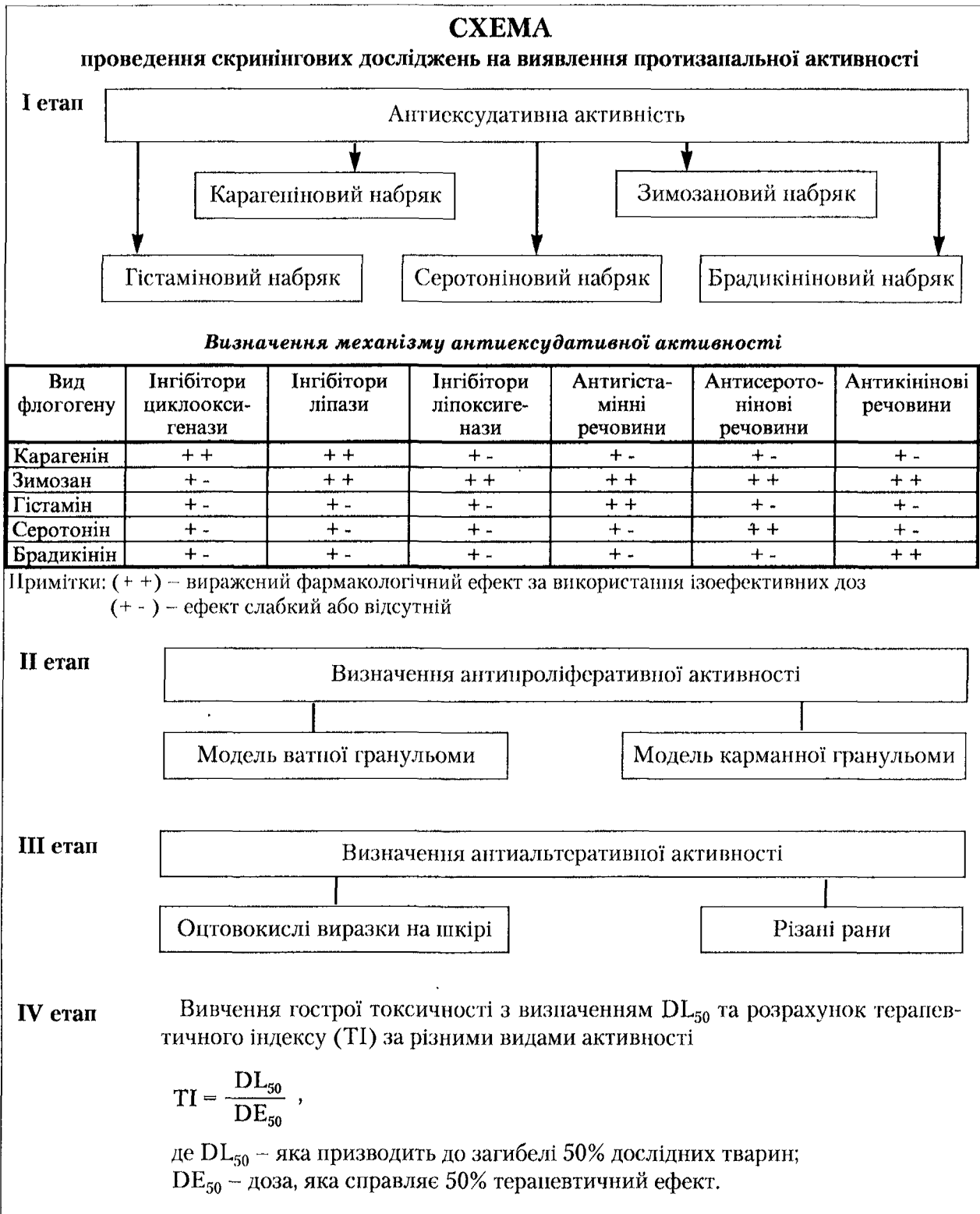
3) безпека виробництва;

4) екологічна чистота виробництва;

5) вартість усіх реагентів, необхідних для виробництва субстанції, що визначить усі накладні витрати і собівартість препарату.

### 3. Поглиблене вивчення специфічної активності речовин

Поглиблене вивчення специфічної активності речовин повинно бути спрямоване на подальше визначення фармакодинаміки відібраних речовин і дослідження селективності (або полівалентності) їх впливу на ті чи інші стадії (форми) запалення. Серед таких можуть бути використані наведені нижче експериментальні моделі.



### 3.1. Поглиблене вивчення антиексудативних властивостей

Антиексудативна активність перспективних речовин може бути вивчена на моделі порушення проникності гематоплеврального бар'єру у щурів внутрішньоочеревинним введенням 6% розчину амонію хлористого з розрахунку 400 мг/кг маси тварин [12]. У печінці амонію хлорид гідролізується з утворенням сечовини і соляної кислоти, яка призводить до зменшення лужних резервів крові, ацидозу, появи гемолізу еритроцитів, метгемоглобіну. Розвивається виражена гіпоксія і ацидоз, які у свою чергу збільшують проникність гематоплеврального бар'єру, що в кінцевому результаті призводить до розвитку альвеолярного набряку легень.

Поряд з місцевими проявами (набряк легень) хлорид амонію індукує системні порушення: синдром «шокового стану», який можна розцінювати як пульмональний шок.

Досліджувані сполуки і стандартні препарати вводять у дозах  $DE_{50}$ , які визначені на моделі карагенінового запалення, за 1 годину до введення  $NH_4Cl$ . Ефективність фармакологічних препаратів оцінюють за виживанням тварин, зменшенням коефіцієнту набряку легень (КНЛ), за яким розраховують антиексудативну активність (А):

$$A (\%) = 100 - \frac{100 \cdot (КНЛ_d - ВКЛ_i)}{КНЛ_k - ВКЛ_i},$$

де  $КНЛ_d$  – коефіцієнт набряку легень у групі тварин, які одержували досліджуваний фармакологічний препарат;

$КНЛ_k$  – коефіцієнт набряку легень у контрольній групі тварин;

$ВКЛ_i$  – ваговий коефіцієнт легень інтактних тварин.

Як допоміжний тест можна використовувати гіперводемичний набряк мозку у щурів, який викликається внутрішньоочеревинним введенням 0,9 %  $NaCl$  в об'ємі 20 % від маси тіла тварин, а також гострий перитоніт у тварин [4]. Активність досліджуваних речовин при введенні за 1 годину до розвитку набряку мозку визначають за інтегральними показниками: виживанням і тривалістю життя тварин, а також за масою мозку і різницею у висушеному і невисушеному вигляді за формулою:

$$A (\%) = 100 - \frac{\Delta M_d \cdot 100}{\Delta M_k},$$

де  $\Delta M_d$  – різниця в масі між набряклим невисušеним і висушеним мозком у дослідній групі тварин;

$\Delta M_k$  – різниця в масі між набряклим невисušеним і висушеним мозком у контрольній групі тварин.

Різноманітні протизапальні засоби впливають на окремі патофізіологічні і біохімічні механізми запалення або на декілька одночасно. Численні дані свідчать про те, що речовини, які виявляють виражену дію при одних видах запалення, є малоефективними або неефективними при інших. Це обумовлено тим, що запалення, яке викликається різноманітними агентами, відрізняється особливостями свого розвитку і факторами, які беруть участь в його генезі. У зв'язку з цим відібрані речовини необхідно вивчати на моделях гострого ексудативного запалення, індукованого різними флогогенними агентами. Їх коротка характеристика наведена в таблиці 3. Досліди проводять на щурах. Флогогенні агенти вводять субплантарно в об'ємі 0,1 мл у відповідних концентраціях (табл. 3). Розвиток гострого ексудативного запалення залежить від якості, хімічної чистоти агентів, тому необхідно намагатися використовувати флогогенні речовини фірм «Sigma», «Werk» та ін. Активність фармакологічних речовин доцільно оцінювати на піках максимального розвитку набряку: гістамінового – 30 хв, формалінового – 180 хв, альбумінового – 120 хв, декстранового, трипсинового та гіалуронідазного – 60 хв, простагландинового – 30–60 хв.

Динаміка запалення, у щурів за дії різноманітних флогогенних речовин (приріст об'єму кінцівки, % відносно вихідного,  $M \pm m$ ) [6]

Флогогенний агент, 0,1 мл субплантарно	Час після ін'єкції, година					
	0,5	1,0	1,5	2,0	2,5	3,0
Декстран, 6%	53,0±13,8	69,0±14,5	68,0±13,9	73,0±14,0	78,0±13,9	78,0±15,8
Серотонін, 0,01%	57,0±7,9	69,0±10,5	67,0±12,3	62,0±8,2	-	54,0±9,7
Гістамін, 0,1%	43,0±4,1	25,0±5,1	21,0±5,3	15,0±2,4	12,0±4,8	15,0±2,7
Овальбумін, 1,5%	40,0±5,2	52,0±5,4	51,0±5,8	56,0±5,8	57,0±7,5	53,0±6,3
Формалін, 2%	35,0±4,8	36,0±4,5	40,0±6,7	40,0±6,5	49,0±9,5	62,0±9,3
Трипсин, 0,5%	84,0±5,3	101,0±6,8	100,0±6,5	95,0±8,1	80,0±14,1	86,0±10,8
Гіалуронідаза, 0,3%	44,0±6,3	59,0±6,6	68,0±6,3	62,0±7,0	50,0±7,5	37,0±8,4
Карагенін, 1%*	36,0±3,7	100,0±8,2	-	201±10	-	383±20
Простагландин E <sub>2</sub> , 1·10 <sup>-6</sup> г/л*	50,0±2,2	67,0±4,8	37,0±2,8	20,0±2,6	-	-

\* Власні дані.

Слід відмітити, що механізм розвитку запальної реакції при карагеніновому набряці відрізняється від такого при формаліновому. M. Di Rosa et al. [18], провівши серію дослідів, встановили таку схему механізму карагенінового набряку: у перші 30–90 хв у патогенезі запалення беруть участь гістамін та серотонін, в інтервалі між 1,5–2,5 годинами – кініні, а між 2,5–5,5 годинами – простагландини.

При формаліновому набряку пусковим моментом у розвитку ексудативного запалення є білкова деструкція мембран.

Різноманітність природного стимулювання процесу ексудації на даних моделях дозволяє припустити механізм антиексудативної дії речовин, які вивчаються.

Крім описаних експериментальних тестів для оцінки антиексудативної дії НПЗЗ, рекомендованих для місцевого застосування, може бути використана модель ексудативного запалення вуха щурів (мишей), викликаного 20% спиртовим розчином сірчаної кислоти, кротоною олією, карагеніном [1].

### 3.2. Поглиблене вивчення антипроліферативних властивостей перспективних речовин

Найраціональнішим є вивчення потенціальних НПЗЗ на моделях артритів.

При цьому дослідження можуть проводитись як на спонтанно виникаючих хронічних проліферативних артритах (наприклад, у свиней), так і на моделях артритів, викликаних впливом на ендокринні залози, імунологічними та фізичними методами, а також внутрішньосуглобовими ін'єкціями інфекційних та хімічних агентів (карагеніну, каоліну, тальку, 6-сульфаніламідоін-дазолу та ін.).

Найзручнішою для вивчення протизапальних засобів є модель так званого «ад'ювантного» артрити, яка вважається найбільш адекватною ревматоїдному артрити у людини.

Згідно з цією методикою, ад'ювант типу Фрейнда (склад: 1 частина ланоліну, 2 частини вазелінової олії та вакцини БЦЖ із розрахунку 5 мг/мл) вводиться підшкірно в дистальну третину хвоста з розрахунку 0,1 мл на щура. Через 1–2 дні у всіх тварин на місці введення ад'юванта розвивається місцева запальна реакція, яка супроводжується значним збільшенням об'єму хвоста. У частини тварин на місці ін'єкції виникають виразки. У наступні дні в підшкірній клітковині хвоста з'являються тверді вузли, некротичні явища посилюються і в окремих випадках призводять майже до гангрені дистальної третини хвоста. Максимум виявлення місцевої запальної реакції в ділянці хвоста спостерігається на 5–10-у добу, потім активність процесу поступово зменшується.

По закінченні латентного періоду (10–14 діб з моменту введення ад'юванта) у 80–90 % тварин розвиваються поліартрити задніх і передніх кінцівок. Найбільш виражені зміни спостерігаються з боку гомілковостопних суглобів задніх кінцівок (дуже виражений набряк, гіперемія, біль та порушення руху). Вищеописані ознаки нерідко супроводжуються вісцеритами, кон'юнктивітами, кератитами, сухістю шкіри. Погіршення стану тварин прогресує і нерідко призводить до загибелі.

Вплив лікарських засобів на розвиток і перебіг ад'ювантних артритів оцінювали за їх здатністю зменшувати біль і набряк кінцівок. Крім того, про ефективність сполук можна судити за об'ємом хвоста (місцева запальна реакція). Об'єм хвоста вимірюють у мірному циліндрі і отриманий результат виражають у мл витиснутої рідини. Для більш об'єктивної оцінки протизапального ефекту слід проводити морфологічне вивчення тканини суглоба, периферичної крові, визначати вміст оксипроліну в сечі, гексозамінів (глюкозаміну) у сироватці крові.

Досліджувані препарати рекомендується вводити перорально 1 раз на добу в дозі  $DE_{50}$  (при вивченні профілактичної дії – з моменту введення ад'юванта; при вивченні лікувального ефекту – з моменту виразної появи генералізації процесу, тобто з 14–18 діб). Тривалість даної моделі – 22–30 діб.

Сучасний асортимент протизапальних препаратів, які поліпшують метаболізм суглобного хряща, є вкрай обмеженим, тому рекомендується вивчати вплив речовин на моделі остеоартрозу у щурів [3]. Як еталонні рекомендується використовувати такі препарати, як артепарон, румалон, мукартрин.

Зважаючи на те, що обов'язковим компонентом патоморфозу остеоартрозів є проліферативне запалення, дистрофія і деструкція суглобного хряща, інтерес викликають препарати, що стимулюють пластичні процеси в хондроцитах і синовіоцитах, а з іншого боку – катаболічні процеси, які уповільнюються у тканинах суглоба. З цих позицій моделі остеоартрозу у щурів віддається перевага. Модель посттравматичного артрозу у щурів, який розвивається у тазостегновому суглобі після нанесення стандартного дефекту (діаметром 2 мм), який проникає через суглобний хрящ у субхондральну кістку. Під гексеналовим наркозом (60 мг/кг) через боковий доступ розрізають тазостегновий суглоб і кератомом проводять різке надавлювання на суглобний хрящ голівки до спеціальної відмітки на кератомі. Витягують кератом і видаляють вміст. Рана запивається пошарово. Дослід триває 30 діб. Після виведення тварин з досліду для подальших досліджень беруть голівки стегнової кістки (3–4-місячних щурів), де визначають рефракцію глюкозоаміноглікану та колагену.

Вплив речовин на хід адріаміцинової кардіоміопатії у щурів також може характеризувати їх ефективність при проліферативному запаленні [10].

Щурам внутрішньобочеревинно і внутрішньовенно одноразово вводять адріаміцин у дозі 20 мг/кг. Вивчають такі показники: виживання тварин, дані ЕКГ, визначають вміст оксипроліну, проводять патоморфологічне дослідження міокарда лівого шлуночка. Досліджувані речовини вводять одноразово в дозі  $DE_{50}$  за протизапальним (антипроліферативним) ефектом протягом 10 днів.

### ***3.3. Поглиблене вивчення антиальтеративних властивостей перспективних речовин***

Відібрані речовини вивчають на моделях запалення з переважанням альтеративних змін, адекватних захворюванням людини. Одна з них – сироватковий алергічний міокардит у кроликів. Тварин сенсibiliзують шляхом триразового введення нормальної кінської сироватки в дозі 0,5 мл/кг, яку вводять через день. Розрішуючу дозу (0,5 мл на тварину) тієї ж сироватки вводять у серцевий м'яз (ділянка лівого шлуночка) на 21 день з моменту закінчення сенсibiliзації. Уведення антигену в серцевий м'яз дозволяє локалізувати запальну реакцію і попередити розвиток анафілактоїдної реакції у кроликів. Досліджувані речовини вводять у добових

дозах  $DE_{30}$  –  $DE_{50}$ , визначених у скринінгових дослідженнях. Контроль за станом тварин проводять згідно з показниками функціонального стану міокарда (ЕКГ) та морфологічних змін у серцевому м'язі в динаміці на 3, 7, 14, 21 день досліду.

Альтеративне ураження міокарда можна викликати у щурів сумісним введенням фуразолідону в дозі 200 мг/кг внутрішньоочеревинно та ізадрину 40 мг/кг внутрішньом'язово через 1 годину після фуразолідону. Досліджувані речовини в дозах  $DE_{30}$  –  $DE_{50}$  вводять протягом 4 днів, ефективність оцінюють за показниками ЕКГ (амплітуда зубця R, частота серцевих скорочень (ЧСС), R-R, підйом сегмента ST над ізолінією), активністю маркерних ферментів пошкодження кардіоміоцитів аспартатамінотрансферази (АсАТ) та лактатдегідрогенази (ЛДГ), результатами патоморфологічного дослідження, ваговим коефіцієнтом серця. Ступінь ушкодження кардіоміоцитів можуть відображати продукти переокислення ліпідів – малоновий діальдегід та дієнові кон'югати (МДА та ДК).

Виражені альтеративні зміни виявляються в печінці при її ураженні тетрахлорметаном, тому дана модель також може бути використана при поглибленому вивченні антиальтеративних властивостей досліджуваних речовин.

Альтеративні зміни є провідним компонентом деструктивних процесів, що виникають у слизовій оболонці шлунка щурів після сумісного перорального введення етилового алкоголю (80%; 0,8 мл) та преднізолону (20 мг/кг). Попередньо за 1 годину до введення агресивних агентів і через 3 години після них вводяться досліджувані речовини перорально в  $DE_{30}$  –  $DE_{50}$ . Через добу після останнього введення речовини тварин декапітують, виймають шлунки, проводять детальний мікроскопічний огляд, підрахунок кількості виразок, площу виразкового ураження, виразковий індекс, % тварин з виразками у групі [6]. Згідно із зазначеними вище показниками визначають антиальтеративну активність речовин.

#### 4. Вивчення анальгезуючих, жарознижуючих та ulcerогенних властивостей нових хімічних сполук

Про анальгезуючу активність досліджуваних препаратів групи НПЗЗ судять за зміною під їх впливом порогу больової чутливості у тварин при різних видах больового подразнення: хімічному – мишам внутрішньоочеревинно вводять 3% оцтову кислоту із розрахунку 300 мг/кг маси тіла. У тварин виникають «корчі» – судомні скорочення очеревинних м'язів, що супроводжуються витягуванням задніх кінцівок і прогинанням спини. Препарати вводять перорально у вказаних у розділі 2.3 дозах за 1 годину до індукції корчів. Ефективність досліджуваних речовин оцінюють за здатністю зменшувати (у %) кількість «корчів» (підрахунок протягом 20 хвилин) у порівнянні з контрольними тваринами.

Дана модель дозволяє виявити анальгетичний ефект, пов'язаний з пригніченням біохімічних альогенів: кінінів, простагландинів, біогенних амінів, виділення яких викликане оцтовою кислотою.

При контактнo-тепловому подразненні визначається вихідна реакція мишей (час початку облизування задніх кінцівок) при розташуванні їх на стандартній пластинці з температурою 55°C (дана температура підтримується за допомогою термостата). Потім швидкість цієї реакції (у сек) враховується після введення тваринам досліджуваної речовини за 1 годину до дослідження, і її зміни виражаються у відсотках від вихідної.

Модель термічного подразнення дозволяє виявити центральний компонент у механізмі анальгетичної дії речовин.

Як препарати порівняння під час вивчення анальгетичної активності НПЗЗ і ненаркотичних анальгетиків доцільно використовувати анальгін,  $DE_{50}$  якого складає 55 мг/кг на моделі «оцтовокислих корчів». На моделі термічного подразнення кінцівок анальгін ефективний у значно вищих дозах, близьких до 1000 мг/кг.

Доцільно також вивчати анальгетичні властивості речовин, які запропоновані для клінічних випробувань, за методом, в основу якого покладений принцип механічного здавлювання кінці-

вок щурів – метод Рондал і Селіто. Ступінь здавлювання реєструється ртутним або механічним манометром і виражається у мм рт.ст. Поява болю фіксується за писком тварини. У даному методі у однієї й тієї ж тварини досліджується реакція на здавлювання як інтактної лапи, так і лапи, в яку за 4 години до досліді субплантарно вводиться 0,1 мл 2 % розчину формаліну. Досліджувані речовини вводяться перорально у вказаних дозах через 2 години після ін'єкції альгогену. Розраховується  $DE_{50}$  за результатами тесту як для здорової кінцівки, так і для кінцівки з запаленням. Анальгезія запальних тканин дозволяє говорити про наявність у механізмі знеболюючої дії, поряд з центральним, також і периферичного компонента. Підвищення порогу больової чутливості на здоровій лапі дозволяє припускати центральні механізми анальгезуючої дії, а підвищення порогу больової чутливості на набряклій кінцівці пов'язане з антиексудативними властивостями речовини і вказує на периферичний компонент анальгезуючої дії.

Крім того, для виявлення участі центральних механізмів в антиноцицептивній дії речовин, які вивчаються, необхідно використовувати серії дослідів з антагоністом опіатних рецепторів налоксоном. Його вводять в інтервалі доз 0,1–1,0 мг/кг внутрішньоочеревинно, паралельно із сполуками, які досліджуються. Дозу налоксона вибирають залежно від необхідності заблокувати ті чи інші опіатні рецептори (-мю, кашпа, сігма, дельта).

Допоміжними тестами для вивчення анальгетичних властивостей можуть служити методи електричного і теплового подразнення хвоста у дрібних лабораторних тварин.

Жарознижуюча властивість відібраних сполук оцінюється за їх спроможністю виявляти гіпотермічний ефект у щурів із лихоманкою, викликаною введенням пірогеналу (внутрішньовенно, 500 МПД/кг маси тіла).

Досліджувані речовини вводять перорально в дозі  $DE_{30}$  –  $DE_{50}$  на фоні максимального підвищення температури (2 години) і динаміку зміни температури реєструють відносно контрольних тварин щогодини протягом 3 годин у прямій кишці термометром.

Як додаткові тести для оцінювання гіпотермічного ефекту препаратів може бути використана також лихоманка, викликана введенням дріжджів, динітрофенолу, знежиреного молока [13].

З метою з'ясування характеру впливу відібраних сполук на слизову оболонку шлунково-кишкового тракту досліджувану речовину вводять щурам внутрішньошлунково в 0,1% суспензії карбоксиметилцелюлози в об'ємі 1 мл/100 г маси тіла. Попередньо тварин витримують протягом доби на голодній дієті з вільним доступом до води. Речовину вводять 1 раз на добу протягом 4-х днів, тварин виводять з експерименту через 24 години після останнього введення. На розтині у всіх тварин проводять макроскопічне дослідження слизової шлунка і дванадцятипалої кишки на наявність виразок. Ульцерогенний ефект оцінюється згідно з такою шкалою: площа виразок у балах -- 1-2  $mm^2$  – 1 бал, 3-5  $mm^2$  – 5 балів, 6-10  $mm^2$  – 10 балів, 11-15  $mm^2$  – 15 балів, 15  $mm^2$  та більше – 20 балів, масивні виразкові ураження – 25 балів.

## 5. Короткі відомості про дослідження, які характеризують нешкідливість НПЗЗ

Вичерпна інформація про дослідження, які характеризують нешкідливість НПЗЗ, є у відповідних нормативних документах ДФЦ МОЗ України [8], що регламентують перелік необхідних досліджень, їх тривалість, вид тварин та дози. Проте залежно від органоспецифічності вона може змінюватись. Якщо препарат рекомендується для лікування опорно-рухового апарату, тривалість хронічної токсичності – 9–12 місяців (на одному виді тварин), 6 місяців – на інших видах. Для лікування запальних захворювань серцевого м'яза період дослідження становить 6 місяців.

Рекомендовані дози: 1; 2,5 і 10  $DE_{50}$  на одному виді тварин, 2,5  $DE_{50}$  – на двох інших.

Окрім гострої і хронічної токсичності, вивчаються: місцевоподразнююча дія (для речовин, що приймаються досередини – відомості про вплив НПЗЗ на слизову оболонку шлунково-кишкового тракту; внутрішньом'язово – місце ін'єкції; місцево – слизові прямої кишки, ока,

**Схема скринінгу і доклінічного вивчення нових НПЗЗ**

**I етап  
(скринінг)**

Вивчення  
антиексудативних  
властивостей

Вивчення  
антипроліферативних  
властивостей

Вивчення  
антиальтеративних  
властивостей

Визначення DE<sub>50</sub>

Визначення DL<sub>50</sub>

**II етап  
(доклінічні  
дослідження)**

Поглиблене вивчення фармакодинаміки відібраних речовин

Антиексудативні властивості (на щурах):  
- набряк легенів;  
- набряк мозку;  
- перитоніт;  
- плеврит;  
- УФ-срительма

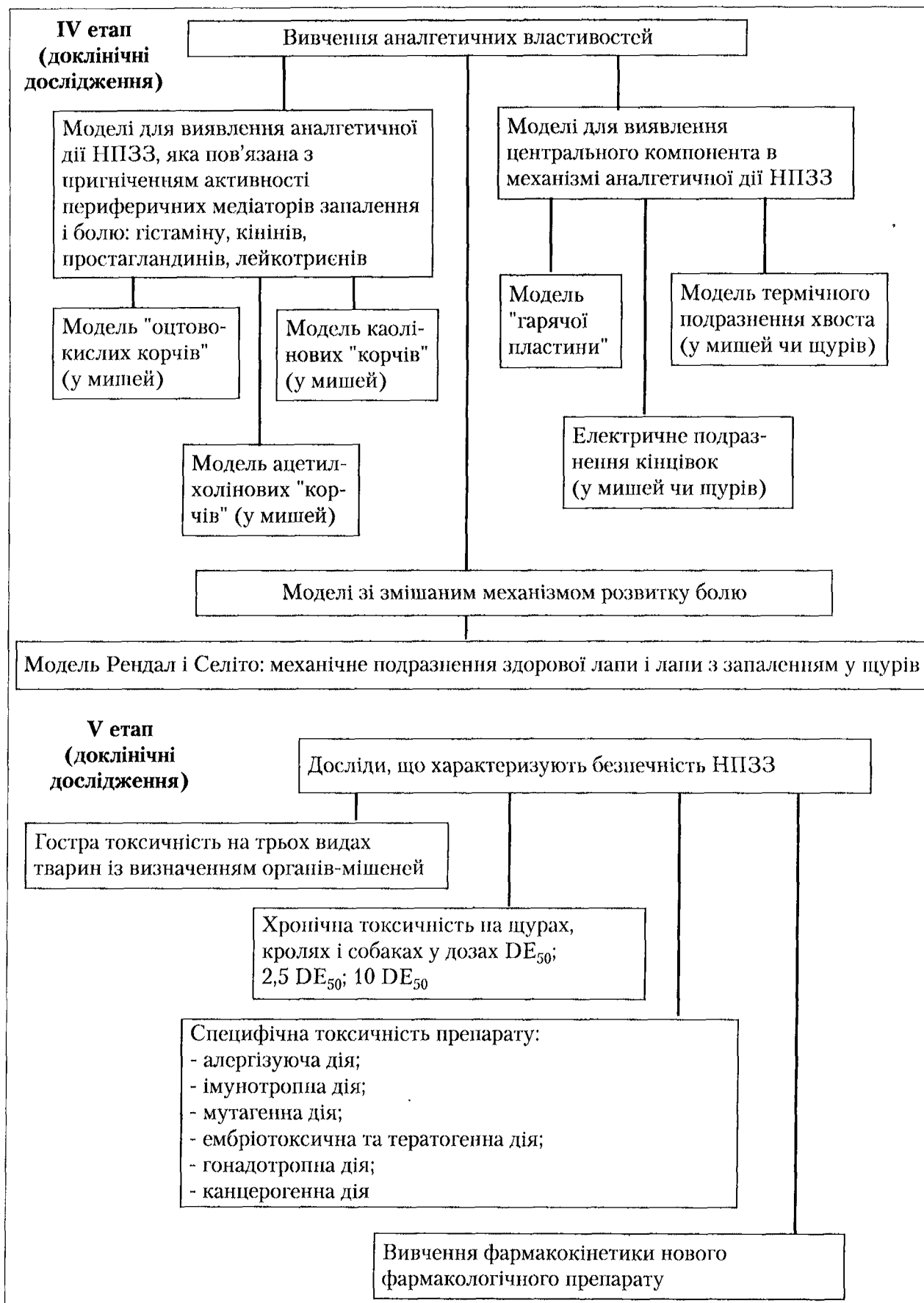
Антиальтеративні властивості (на щурах):  
- ізадринний (ізадринно-фуразолідоновий) міокардит;  
- алкогольно-фуразолідонова кардіоміопатія;  
- адриаміцинова кардіопатія;  
- гепатит CCl<sub>4</sub>;  
- алкогольно-преднізолонове ушкодження шлунка

Антипроліферативні властивості (на щурах):  
- ватна гранульома;  
- артрити;  
- ад'ювантний артрит;  
- остеоартроз

**III етап  
(доклінічні  
дослідження)**

Вивчення можливого механізму дії:  
- вплив на біосинтез простаноїдів;  
- аналіз протинабрякової дії (гістаміновий, серотоніновий, декстрановий, трипсиновий, гіалуронідазний, PGE<sub>2</sub> набряки);  
- вплив на кінінову систему;  
- мембранні властивості;  
- участь в антиоксидантній системі;  
- лізосомальна активність;  
- участь в нейро-гуморальній регуляції (гіпофіз-надниркова);  
- дія на клітинні елементи осередку запалення





ротової порожнини), кумулятивні, алергізуючі, імунотропні, мутагенні, ембріотоксичні та тератогенні властивості.

На першу фазу клінічних досліджень бажано подати дані про експериментальне вивчення лікування отруєнь, викликаних передозуванням речовини.

## **Література**

1. Гацура В.В. Методы первичного фармакологического исследования биологически активных веществ.– М.: Медицина, 1974.– 143 с.
2. Гончар А.М., Коган А.С., Салганик Р.И. Раневой процесс и иммобилизованные протеолитические ферменты.– Новосибирск: Наука, 1986.– 29 с.
3. Дедух Н.В., Зупанец И.А., Черных В.Ф., Дроговоз С.М. Остеоартрозы: пути фармакологической коррекции.– Х: Основа, 1992.– 140 с.
4. Ерюхин И.А., Белый В.Я., Вагнер В.К. Воспаление как общебиологическая реакция на модели острого перитонита.– Л.: Наука, 1989.– 262 с.
5. Захаревский А.С. Влияние некоторых производных индола на нервную систему: Автореф. дис. ...канд. мед. наук.– Минск, 1969.– 78–80 с.
6. Зупанец И.А., Бездетко Н.В., Речкиман И.Э., Семенов А.Н. Перспектива использования аминсахаров при язвенных поражениях желудка//Гастроэнтерол.– 1991.– Вып. 23.– С. 50–53.
7. Лещинский А.Ф., Зуза З.И. Пелоидо- и фармакотерапия при воспалительных заболеваниях.– К.: Здоров'я, 1985.– 184 с.
8. Методические рекомендации по представлению документации на лекарственные средства в Фармакологический комитет Министерства здравоохранения Украины.– К., 1993.– 36 с.
9. Пастушенко Т.В., Маруший Л.Б., Жуков А.А., Пилипенко Ю.А. Экспресс-метод определения среднесмертельных доз химических веществ//Гигиена и санитария.– 1985.– №6.– С. 46–48.
10. Семенова Л.А., Непомнящих Л.М., Семенов Д.Е. Морфология пластической недостаточности мышечных клеток сердца.– Новосибирск: Наука, 1985.– 241 с.
11. Сигидин Я.А., Шварц Г. Я., Арзамасцев А.П., Либерман С.С. Лекарственная терапия воспалительного процесса.– М.: Медицина, 1988.– 240 с.
12. Триняк В.Г. Особенности развития и течения острого отека легких в условиях гипер- и гипотермии на фоне эфирного наркоза//Бюлл. эксперим. биол. и мед.– 1986.– №7.– С. 40–41.
13. Тринус Ф.П., Клебанов Б.М., Мохорт Н.А. Методы скрининга и фармакологического изучения противовоспалительных, анальгезирующих и жаропонижающих веществ (методические рекомендации).– К., 1974.– 27 с.
14. Тринус Ф.П., Мохорт Н.А., Клебанов Б.М. Нестероидные противовоспалительные средства.– К.: Здоров'я, 1975.– 240 с.
15. Тринус Ф.П., Клебанов Б.М., Ганджа И.М., Сейфулла Р.Ф. Фармакологическая регуляция воспаления.– К.: Здоров'я, 1987.– 144 с.
16. Чекман И.С. Осложнения фармакотерапии.– К.: Здоров'я, 1980.– 235 с.
17. Яковлева Л.В., Зупанец И.А. Использование модели каррагенинового отека у мышей при поиске противовоспалительных средств.– Х., 1987.– 6 с. /Харьк. гос. фармац. ин-т. Деп. в Укр НИИТИ 07.07.87.– № 1908– Ук 87.
18. Di Rosa M., Giroud J.P., Willoughby D.A. Studies on the mediators of the acute inflammatory response induced in rats in different sites by carrageenan and turpentine//J. Patol.– 1971. V.104, №15.– P. 29.
19. Gado K., Gigler G. Zymosan inflammation: A new method suitable for evaluating new anti-inflammatory drugs//Agents and Actions.– 1991.– V.32, №1–2.– P. 119–121.
20. Wauwe van J.P., Goossens J.G. Arabinogalactan – and dextran – induced ear inflammation in mice: Differential inhibition by H-antihistamines 5-HT – serotonin antagonists and lipoxygenase blockers//Agents and Actions.– 1989.– V.28, №1–2.– P. 78–82.

# ПОШУК ТА ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНЕ ВИВЧЕННЯ ФАРМАКОЛОГІЧНИХ РЕЧОВИН, ЯКІ ПРОПОНУЮТЬСЯ ЯК НЕНАРКОТИЧНІ АНАЛГЕТИКИ

Мохорт М.А.,  
Яковлева Л.В.,  
Шаповал О.М.

## Перелік скорочень

**АСК** – ацетилсаліцилова кислота  
**ГАМК** – гамма-аміномасляна кислота  
**ДА** – дофаміновий  
**ЛОГ** – ліпоксигеназа  
**ЛРЯ** – латеральне ретикулярне ядро  
**ЛТ** – лейкотрієни  
**НА** – наркотичні аналгетики  
**ННА** – ненаркотичні аналгетики  
**НПЗЗ** – нестероїдні протизапальні засоби  
**ПГ** – простагландини  
**ЦОГ** – циклооксигеназа  
**ЦСР** – центральна сіра речовина

## Вступ

Проблема болю та аналгезії займає одне з центральних місць в сучасній медицині та біології і є предметом широкомасштабного мультидисциплінарного дослідження.

Біль – не тільки симптом багатьох гострих та хронічних захворювань, але й складний психофізіологічний феномен, який залучає механізми регуляції та формування емоцій, моторні, гуморальні та гемодинамічні реакції.

Специфічна фармакологічна корекція болю здійснюється препаратами групи наркотичних і ненаркотичних аналгетиків та нестероїдних протизапальних засобів (ННА та НПЗЗ). Наркотичні аналгетики (НА) проявляють виражену центральну аналгетичну дію, що дозволяє використовувати їх для лікування болів високої інтенсивності, небезпечних для життя людини. В дії ННА та НПЗЗ переважає периферична аналгетична дія, за рахунок якої препарати цієї групи ефективні при болях помірної інтенсивності, безпечних для життя.

Застосування препаратів групи ННА та НПЗЗ часто супроводжується розвитком таких побічних ефектів, як гастротоксичність, гепатотоксичність, нефротоксичність та інших, які пов'язані з особливостями їх механізму дії. Одним із механізмів дії препаратів групи ННА та НПЗЗ є пригнічення біосинтезу простагландинів (ПГ) і лейкотрієнів (ЛТ), які утворюються в процесі метаболізму арахідонової кислоти за участю ферментів циклооксигенази (ЦОГ) та лі-

поксигенази (ЛОГ). ПГ та ЛТ беруть участь не тільки в розвитку патологічних процесів (болю, запалення), але й в регуляції функціональної діяльності багатьох органів і систем організму. Відомо, що фермент ЦОГ має дві ізоформи ЦОГ-1 та ЦОГ-2. Ізофермент ЦОГ-1 контролює синтез ПГ, які регулюють мікроциркуляцію в слизовій оболонці шлунка, функцію тромбоцитів та нирковий кровоток. Ізофермент ЦОГ-2 приймає участь в біосинтезі ПГ, які відповідають за протікання запальних процесів. Препарати групи ННА та НПЗЗ (анальгін, парацетамол, ацетилсаліцилова кислота (АСК), індометацин, вольтарен, піроксикам та ін.) пригнічують і ЦОГ-1 і ЦОГ-2, тому, поряд із значною фармакологічною дією вони проявляють характерні побічні ефекти. Побічні ефекти ННА та НПЗЗ обумовлюються також тим, що коли пригнічується ЦОГ, метаболізм арахідонової кислоти йде за ліпоксигеназним шляхом і підсилюється біосинтез ЛТ, які також можуть спричинювати ушкодження печінки, нирок, слизової оболонки шлунка та ін. Тому зараз існує декілька напрямків пошуку та створення нових ННА та НПЗЗ. Одними з них є пошук і створення селективних інгібіторів ЦОГ-2 і селективних інгібіторів ЛТ. Так, створені і застосовуються в клініці селективні інгібітори ЦОГ-2 мелоксикам, месулід, німесулід, лорноксикам, які характеризуються вираженими анальгетичними, протизапальними та жарознижувальними властивостями та мінімумом побічних ефектів.

Проте, значний арсенал сучасних ННА та НПЗЗ і створення нових селективних інгібіторів ЦОГ-2 не вирішують проблему виникнення побічних ефектів при тривалому застосуванні препаратів цієї групи в клініці. Крім того, поряд із новими засобами, широко використовуються традиційні (парацетамол, анальгін, аспірин, вольтарен, піроксикам та ін.), які не позбавлені шкідливого впливу на організм людини. Тому в Україні гострою проблемою залишається забезпечення населення препаратами цієї групи: номенклатура сучасних вітчизняних ННА представлена в основному генеричними препаратами і не задовольняє потреб населення, а сучасні імпортовані лікарські засоби залишаються дорогими та малодоступними для широкого кола громадян.

У даних Методичних рекомендаціях, на думку авторів, наведена оптимальна схема пошуку ННА, яка дозволяє виділити ефективні фармакологічні речовини, вивчити периферичні та центральні механізми їх анальгетичної дії. Описаний підхід дозволяє прогнозувати вірогідність розвитку фізичної залежності при застосуванні препаратів, а також можливі альтернативні механізми анальгетичної дії.

### 1. Патологічні механізми больового синдрому

Лікування больового синдрому - одна з найбільш складних проблем, що стосується багатьох областей клінічної медицини. Рационалізація застосування існуючих та вишукування нових методів та засобів боротьби із болем потребує ясних уявлень про фізіологічні, біохімічні та психофізіологічні механізми формування болю та проведення больових імпульсів по ЦНС.

На сучасному етапі існує декілька загальних теорій, які пояснюють принципи формування больового збудження. Найбільш загальноприйнятим вважається уявлення про те, що формування болю можна пояснити за допомогою теорії специфічності та теорії інтенсивності [1].

Концепція теорії специфічності болю розглядає його як специфічну модальність, що формується під впливом тільки больових подразників. Це підтверджується існуванням високотемпературних рецепторів, які локалізуються в шкірі, сухожилках, м'язах, судинах і т.д. та активуються під впливом сильних і ушкоджуючих подразників. До таких стимулів можна віднести механічні пошкодження, високотемпературні та хімічні впливи. Ці рецептори є больовими або ноцицепторами [2-4].

Однак, існують дані про те, що больове збудження виникає при подразненні не тільки специфічних ноцицепторів, але й полімодальних або неноцицептивних рецепторів. В цьому випадку формування больового збудження можна пояснити з позиції теорії інтенсивності або теорії неспецифічності болю. Суть останньої зводиться до того, що в периферичних механізмах виникнення болю основне значення відводиться просторово-часовому співвідношенню

аферентних імпульсів та сумації сенсорних подразнень (навіть невеликих), які, досягаючи критичного рівня, викликають виникнення больового відчуття [1, 5].

Обидва уявлення про механізми болю мають свої сильні і слабкі сторони, проте теорія специфічності набуває все більш вагомі експериментальні докази [6]. Такому положенню в значній мірі сприяло відкриття в центральній нервовій системі опіатних рецепторів [7], виділення та встановлення біологічної ролі енкефалінів, а також ряду біологічно активних речовин, таких як ацетилхолін, катехоламіни, гістамін, серотонін, кініни, ПГ, ЛТ, іони  $K^+$  і  $Ca^{++}$ , та інші [8, 9, 10], які сприяють передачі збудження по нервових шляхах та проведенню ноцицептивної сигналізації, виконуючи тим самим функцію медіаторів болю. Вони можуть вивільнятися з депо або накопичуватися в тканинах у результаті деяких патологічних процесів, чи то при ушкоджуючій дії на тканину різноманітних агресивних хімічних агентів або фізичних факторів, опосередковуючи тим самим їх ноцицептивну дію або сенсibilізуючи ноцицептори [8, 11–18]. Все це підтверджує положення про те, що больова реакція є специфічним в нейрохімічному відношенні інтегративним станом мозку [19].

Останніми роками широке розповсюдження одержала теорія «воротного контролю» або «вхідних воріт», яка дає пояснення виникнення болю на основі нейрофізіологічної модуляції больового сигналу на рівні спинного мозку. Теорія «воротного контролю» пропонує модель, у відповідності з якою нервові імпульси, викликані больовим стимулом, контролюються в задніх рогах спинного мозку, функція яких пов'язана з модифікацією висхідного ноцицептивного потоку по периферичних нервових волокнах. У випадку, коли «ворота» знаходяться у відчиненому стані, ноцицептивна інформація досягає головного мозку, викликаючи формування психофізіологічного стану, що кваліфікується як біль. При частково або повністю «закритих воротах» передача в головний мозок ноцицептивного аферентного потоку різко зменшується або припиняється. Дослідження за допомогою мікроелектронної техніки показали, що нервові клітини, які реагують на больове подразнення, розташовані практично в усіх структурах головного мозку, але частіше за все зустрічаються у ретикулярній формації стовбура і таламусу. Участь багатьох структур головного мозку в формуванні больового збудження і механізмах знеболювання з позиції теорії «воротного контролю» дає можливість задовільного пояснення їх функціональної ролі у процесах просторово-часової обробки аферентних входів, а також їх сумації на різних рівнях нервової системи. Крім цього, включення супраспинальних утворень в структуру механізмів «воротного контролю» дозволяє враховувати психоемоційний статус в оцінці больових станів і пов'язаної з ним поведінки.

Поряд із багатьма позитивними моментами, теорія «воротного контролю» не позбавлена слабких сторін. Пояснюючи розвиток больових синдромів зміною аферентного потоку з периферії, ця теорія не спроможна пояснити механізми больових синдромів центрального походження, коли біль виникає в умовах відсутності висхідного аферентного потоку з периферії [1].

Задовільне пояснення механізмів розвитку болю центрального походження дає розроблена нещодавно теорія генераторних механізмів центральних больових синдромів [2]. У відповідності з цією концепцією, одним із головних чинників в розвитку болю центрального походження є виникнення на різних рівнях ЦНС генератора надмірного збудження як нового функціонального утворення і пригнічення гальмівних впливів, яке призводить до підсиленого збудження груп нейронів різних структур мозку в результаті розгальмовування їх активності. Ефект розгальмовування активності нейронів може проявлятися як у випадку локального пошкодження мозку, так і при пошкодженнях периферичних відділів нервової системи. Крім цього, формування генератора збудження відбувається у процесі розвитку периферичного болю при масивній і тривалій активації сенсорних нейронів.

Перевагою теорії генераторних механізмів центральних больових синдромів над іншими є не тільки можливість пояснення патогенезу болю, але й адекватне уявлення на її основі щодо дії лікувальних заходів, спрямованих на усунення больового синдрому. Відповідно до цих

уявлень, терапевтичний ефект будь-яких аналгетичних впливів, як фізичних, так і фармакологічних, пов'язаний із активацією антисистем, у рамках яких виникають більш сильні генератори збудження, які здатні пригнічувати активність патологічного генератора, що безпосередньо формує больовий синдром.

Формування і розповсюдження в останні десятиліття уявлень про існування так званих «аналгетичних (антиноцицептивних) зон мозку», електрична стимуляція яких викликає феномен знісболювання, визначило новий підхід до вивчення проблем болю [19–23].

Результати систематичних досліджень, які проведені на основі уявлень про аналгетичні зони мозку, дозволили сформулювати положення про існування ендогенних знеболюючих систем мозку і в подальшому з'ясувати їх морфо-функціональну організацію. Згідно з цією теорією основне місце в ряду аналгетичних зон мозку, за цією теорією, займає центральна сіра речовина (ЦСР) [5, 24].

Ендогенна аналгетична система організму має надзвичайно складну організацію. Різноманітні точки системи і утворення ЦНС узгоджено приймають участь у процесі сприйняття сигналу ноцицепції, аналізі цієї інформації і утворенні відповідної форми реакції на вплив. Не вдаючись у поглиблений розгляд морфології і цитоархітекτονіки цих структур ЦНС, слід зазначити, що ядра, відомі під назвою «ростровентральний стовбур», латеральне ретикулярне ядро (ЛРЯ) та інші – є важливими ланками ланцюга, що утворює ендогенну аналгетичну систему ЦНС. ЛРЯ чинить постійне тонічне низхідне гальмування і його нейрони виконують функції релейної ланки у системі ЦСР – ядра шва – спинний мозок. Крім цього, ЛРЯ одночасно відіграють велику роль у регуляції гемодинаміки [5, 25].

Аналгезія, яка виникає при подразненні ЦСР та ядер шва, усувається інгібітором синтезу серотоніну. Нині більшість дослідників припускають, що норадреналінергічні впливи регулюють сегментарні процеси ноцицепції і чинять модулюючу дію на рівні спинного мозку на низхідні волокна серотонінергічної системи.

Відкриття опіатних рецепторів та їх ендогенних лігандів обумовили виникнення нових уявлень про опіоїдергічні механізми регуляції болю. В наші дні переконливо продемонстровано спільність механізмів реалізації аналгезії, яка виникає при введенні опіатів та стимуляції аналгетичних зон мозку.

Різноманітність чинників виникнення болю, нейрофізіологічних та нейрохімічних аналгетичних систем мозку, несхожість механізмів реалізації в ЦНС ноцицептивної інформації, вочевидь, обумовлюють неопозначеність існуючих критеріїв оцінки болю в сучасній клінічній медицині.

На схемі 1 наведена загальноприйнята класифікація болю.

Залежно від джерела болю може бути соматичним або

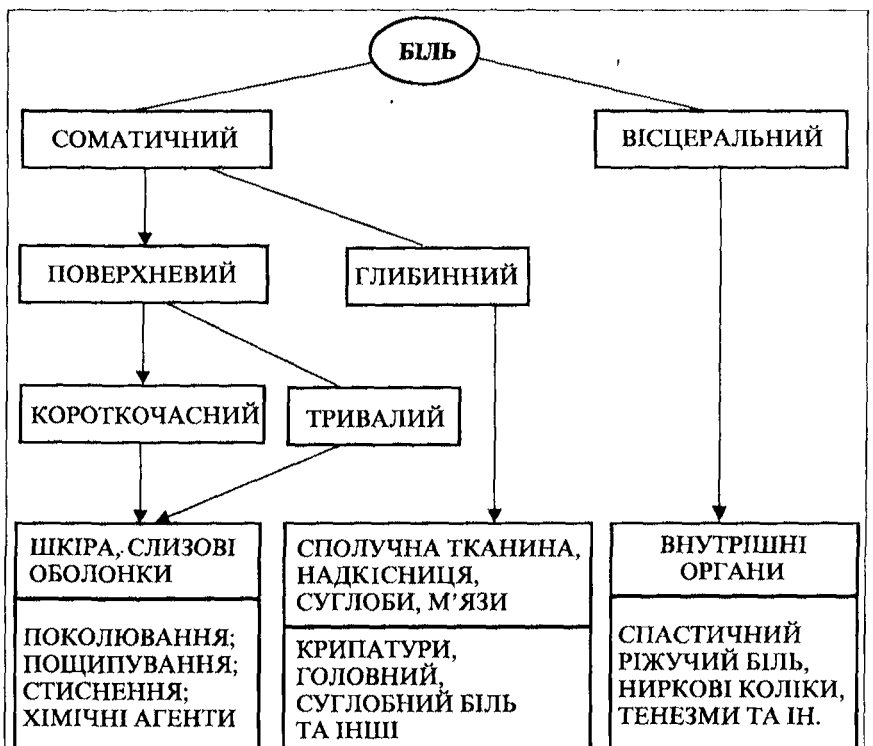


Схема 1. Класифікація різноманітних видів болю відповідно до місця його виникнення та характеру.

вісцеральним. Соматичний біль виходить із скелетно-м'язової системи та шкіри, а вісцеральний пов'язаний з органами грудної клітини та черевної порожнини [8, 20].

Виникнення гострого соматичного болю частіше за все обумовлено пошкодженнями тканин і вивільненням внутрішньоклітинних хімічних медіаторів, таких як гістамін, брадикінін, серотонін, ЛТ та ПГ, які впливають на нервові закінчення, дифузно розміщені в різних тканинах, включаючи шкіру, м'язи, сухожилки, суглобні поверхні та кісткові оболонки. Больовий імпульс надходить до спинного, а потім і до головного мозку. Через один нервовий плях сприймається інтенсивність і локалізація болю, другий плях визначає його емоційну реакцію.

Вісцеральний біль пов'язаний з ішемією, хімічним ушкодженням (наприклад, дією кислоти та протеолітичних ферментів при пептичних виразках), спазмами та розтягуванням гладеньких м'язів внутрішніх органів. Вісцеральний біль відрізняється від соматичного тим, що він супроводжує локальне ушкодження внутрішніх органів і має характер ірадіації, мозок сприймає його так, ніби він іде від певної частини поверхні шкіри, з цим пов'язані зони Захар'їна-Геда.

Невралгічні болі пов'язані з ушкодженням або хронічними змінами соматичних сенсорних нервових стовбурів; вони можуть виникати і тривало зберігатися без будь-яких тканинних ушкоджень. Такі болі інколи супроводжуються втратою чутливості, м'язовою слабкістю, підвищеною чутливістю до механічного впливу, пароксизмами гострих больових відчуттів.

Сьогодні для лікування больових синдромів різноманітної етіології застосовується широкий спектр методів та засобів, таких як терапія НА та ННА, місцева та епідуральна анестезія, рефлексотерапія, фізіотерапевтичні методи аналгезії, психологічна терапія, включаючи гіпноз.

## 2. Механізми дії ненаркотичних аналгетиків

Лікарські засоби групи ННА та НПЗЗ застосовуються для усунення або полегшення больових синдромів, безпечних для життя людини (головний, зубний біль, невралгії та ін.). Препарати цієї групи, поряд з аналгетичними, проявляють також протизапальні та жарознижуючі властивості, в силу чого вони широко застосовуються для лікування болю, який обумовлений запальними хворобами (ревматоїдні захворювання, радикуліт, міалгії та ін.) [27].

У механізмі знеболюючої дії ННА та НПЗЗ виділяють периферичний і центральний фактори впливу на поциентивну систему. Аналгетичний ефект ННА та НПЗЗ спрямований в основному на периферичні механізми формування болю і пов'язаний з пригніченням синтезу ПГ, ЛТ, біогенних амінів та кінінів. Антиексудативні властивості препаратів цієї групи також відіграють важливу роль у механізмі їх периферичної аналгетичної дії, тому що медіатори болю є одночасно і медіаторами запалення та виділяються в періоди загострення запального процесу [28, 29].

Центральний компонент аналгетичної дії ННА та НПЗЗ пов'язаний з пригніченням в області таламусу міжнейронної передачі імпульсів, які виникають при больовому подразненні [30, 31]. В механізмі аналгетичної дії можуть приймати участь моноамінергічні системи. Можлива також центральна аналгетична дія неопіоїдної природи [30].

Дослідження механізмів аналгетичної дії існуючих ННА та НПЗЗ показало, що анальгін пригнічує проведення імпульсів по висхідних волокнах спинного мозку при стимуляції аферентних С-волокон [30], вольтарен та пірпрофен викликають зниження β-ендорфіну в гіпофізі і гіпоталамусі [32], похідні піразолону здатні підсилювати вивільнення ендогенних β-ендорфінів [30, 32, 33].

Препарати групи ННА та НПЗЗ мають різну вираженість аналгетичного ефекту, і їх можна розгашувати у ряд за зменшенням аналгетичної активності: піроксикам, вольтарен, напроксен, індометацин, анальгін, бутадіон, реопірін, мефенамова кислота, парацетамол, саліциламід, АСК [29].

Прояви різних побічних ефектів при застосуванні ННА та НПЗЗ пояснюються їх невибірковим впливом на біосинтез ПГ. Наприклад, ульцерогенна дія препаратів цієї групи пов'язана з пригніченням у слизовій оболонці шлунка синтезу ендогенних ПГ, які забезпечують мікро-

циркуляцію [34, 35]. Послаблення течії плазми у нирках та зменшення фільтрації у клубочках також пов'язують з порушенням синтезу ПГ під впливом ННА та НПЗЗ [36]. Вплив останніх на систему зсідання крові та агрегацію тромбоцитів також пояснюють гальмуванням біосинтезу ПГ і тромбоксану [37].

Останніми роками номенклатура вітчизняних ННА та НПЗЗ не поповнювалась принципово новими лікарськими засобами, які б проявляли виражену ефективність, мінімум побічних реакцій та мали нові механізми дії [38], що свідчить про необхідність пошуку і створення нових вітчизняних лікарських засобів групи ННА та НПЗЗ, які характеризувалися б зазначеними властивостями.

Підходи до пошуку та вивчення ННА та НПЗЗ базуються на знаннях про сучасні аспекти патогенезу болю, що дозволяє знайти фармакологічні речовини, які інгібують медіатори болю: кініни, біогенні аміни, продукти метаболізму арахідонової кислоти – ПГ і ЛТ, а також пригнічують проведення больових імпульсів різноманітними ланками ЦНС.

### 3. Скринінгові дослідження фармакологічних речовин

Першим етапом пошуку нових ННА є скринінгове дослідження периферичного компоненту анагетичного ефекту фармакологічних речовин. Для вивчення механізмів периферичної анагетичної дії препаратів використовується ряд моделей периферичного болю: оцтовокислі, ацетилхолінові та каолінові «корчі», в основі яких лежить хімічне больове подразнення [39]. Класичною скринінговою моделлю є «оцтовокислі корчі». Внутрішньоочеревинне введення розчину оцтової кислоти сприяє загальній активації ноцицептивної системи та місцевому вивільненню брадикініну, гістаміну, серотоніну, ПГ і ЛТ, яке призводить до розвитку мимовільних скорочень черевних м'язів живота – «корчів», які супроводжуються витягуванням задніх кінцівок і вигинанням спини./

Корчі викликають 0,6% розчином оцтової кислоти з розрахунку 0,1 мл на 10 г маси тварини, який вводять внутрішньоочеревинно через 1 год після перорального введення, через 20 хв – після внутрішньом'язового і через 10 хв – після внутрішньоочеревинного введення досліджуваних речовин. За тваринами спостерігають протягом 20 хв і підраховують кількість корчів. Анагетичну активність оцінюють за здатністю речовини зменшувати кількість корчів у дослідній групі тварин порівняно з контрольною і виражають у відсотках, розрахунок ведуть за нижченаведеною формулою:

$$AA = \frac{C_k - C_d}{C_k} \cdot 100\% ,$$

де AA – анагетична активність у %;

$C_k$  – середня кількість корчів у контрольній групі;

$C_d$  – середня кількість корчів у дослідній групі.

Досліджувані речовини вивчають у кількох дозах, підібраних емпірично, що дозволяє розрахувати  $ED_{50}$  та її довірчі інтервали за методом найменших квадратів [40, 41], а також терапевтичний індекс ( $TI = LD_{50}/ED_{50}$ ). Якщо речовина не має вираженого анагетичного ефекту, то, за необхідності, розраховують  $ED_{40}$ ,  $ED_{30}$ ,  $ED_{20}$ .

Для порівняльного аналізу анагетичної дії досліджуваних речовин паралельно проводять вивчення еталонних препаратів, які є представниками групи ННА та аналогами за дією. В якості таких препаратів можуть бути використані анальгін, парацетамол, а також препарати групи НПЗЗ, у яких є виражений анагетичний ефект: вольтарен, індометацин, АСК та ін.

У процесі проведення скринінгових досліджень анагетичної активності фармакологічних речовин одним із складних питань є вибір інтервалу доз, який дозволить розрахувати ізоефективні дози. Ізоелективні дози ( $ED_{30}$ ,  $ED_{40}$ ,  $ED_{50}$ ) є основним критерієм кількісної характерис-



тики фармакологічного ефекту, але в якості допоміжних можуть бути використані і еквімолярні дози щодо еталонного препарату, якщо він близький за структурою.

Враховуючи дані літератури і власний досвід [40, 41], слід рекомендувати використання широкого діапазону доз при дослідженні аналгетичної дії нових субстанцій, починаючи з дози 0,1 мг/кг і збільшуючи її в геометричній прогресії з коефіцієнтом 3, тобто: 0,3; 0,9; 2,7; 9; 27; 81; 243; 2187 мг/кг і т.д. у міру необхідності. Реалізація такого підходу потребує значних матеріальних витрат, що на практиці привело нас до деяких спрощень вибору доз для скринінгу з урахуванням інтервалу практичної значимості.

Якщо група нових фармакологічних речовин не має аналога за структурою серед еталонних препаратів, то слід вивчити їх аналгетичну активність у 3–4 дозах: 0,1; 1,0; 5,0; 20,0 мг/кг з подальшим розрахунком  $ED_{30}$ ,  $ED_{40}$  або  $ED_{50}$ .

Якщо ж нові субстанції є аналогами за структурою одного з існуючих ННА (еталонних препаратів), то доцільно вивчити їх аналгетичну дію в дозах, які еквімолярні  $ED_{50}$  еталонного препарату. Далі для ефективних речовин слід розширити діапазон доз в інтервалі, близькому до еквімолярної дози, з метою розрахунку  $ED_{50}$ .

#### 4. Поглиблене вивчення периферичного компоненту аналгетичної дії ненаркотичних аналгетиків

Аналіз результатів первинного фармакологічного скринінгу дозволяє виділити перспективні речовини для створення на їх основі ненаркотичних аналгетиків. Нові препарати повинні бути конкурентоспроможними (виражена ефективність та велика широта аналгетичної дії) і економічно доцільними. Все це разом визначається як фармакоекономічність.

Далі слід провести поглиблене дослідження периферичних механізмів аналгетичної дії відібраних субстанцій. Для цього необхідно використовувати моделі периферичного болю, в основі яких лежить хімічне больове подразнення, спричинене внутрішньоочеревинним введенням ацетилхоліну або каоліну. Останні діють вибірково на периферичну ноцицептивну систему і специфічно стимулюють виділення відповідних медіаторів болю: ацетилхолін – ПГ, а каолін – брадикініну [39, 43]. Внутрішньоочеревинне введення ацетилхоліну та каоліну лабораторним тваринам (миші, щури) призводить до виникнення мимовільних скорочень черевних м'язів живота – «корчів», які супроводжуються витягуванням задніх кінцівок та вигинанням спини аналогічно «оцтовокислим корчам».

«Корчі» викликають 0,7% розчином ацетилхоліну – 0,2 мл на тварину або суспензією каоліну в концентрації 0,5% – 0,5 мл на тварину, які вводять внутрішньоочеревинно через 1 год після перорального введення, через 20 хв – після внутрішньом'язового і через 10 хв – після внутрішньоочеревинного введення досліджуваних речовин. За тваринами спостерігають протягом 10 хв і підраховують кількість корчів кожної тварини. Аналгетичну активність оцінюють за здатністю речовини зменшувати кількість корчів у дослідній групі тварин порівняно з контрольною і виражають у відсотках, розрахунок ведуть за нижченаведеною формулою:

$$AA = \frac{C_k - C_d}{C_k} \cdot 100\% ,$$

де AA – аналгетична активність у %;

$C_k$  – середня кількість корчів у контрольній групі;

$C_d$  – середня кількість корчів у дослідній групі.

Досліджувані речовини вивчають у порівнянні з еталонними препаратами у діапазоні доз, близьких до  $ED_{50}$  цих субстанцій, на моделі «оцтовокислих корчів». Використання кількох доз речовин дозволяє розрахувати ізоефективні дози ( $ED_{50}$ ) на відповідних моделях, терапевтичний індекс ( $TI = LD_{50}/ED_{50}$ ), а також зробити припущення про вплив фармакологічних речовин на медіатори болю.

## 5. Вивчення центрального компоненту аналгетичної дії ненаркотичних аналгетиків

У механізмі аналгетичної дії препаратів групи ННА виділяють, окрім периферичного, і центральний компонент впливу на ноцицептивну систему, який пов'язують з пригніченням в області таламусу міжнейронної передачі больових імпульсів.

Вплив нових і еталонних препаратів на центральний компонент ноцицептивної системи слід вивчати на моделях термічного («гаряча пластина») і електричного подразнення кінцівок мишей та термічного подразнення хвоста щурів, у яких задіяні центральні механізми формування болю [44, 45].

Усі три методики відповідають такій схемі експерименту:

1. Визначення початкового порогу больової чутливості у всіх тварин під впливом відповідного ноцицептивного подразника: при вивченні досліджуваних речовин на моделі «гаряча пластина» як подразник використовується укріплена в ультратермостаті металева пластина з  $t=54,6^{\circ}\text{C}$  і обчислюється час відповідної реакції в сек (облизування лапок, вишлігування, писк); на моделі електроподразнення кінцівок використовується імпульсний струм напругою від 1 до 100 В і підраховується напруга, яка викликає відповідну рухову реакцію, що супроводжується писком; на моделі термоподразнення хвоста щурів використовується гаряча вода з  $t=60^{\circ}\text{C}$  і підраховується час відповідної реакції в сек (витягування хвоста з води).

2. Введення перорально або парентерально дослідним тваринам досліджуваних речовин, контрольним – розчинника.

3. Реєстрація динаміки порогу больової чутливості протягом 5 год через кожні 30 хв у дослідних і контрольних групах тварин.

4. Аналгетична активність визначається за здатністю досліджуваних речовин змінювати поріг больової чутливості дослідних тварин порівняно з контрольними і виражається у відсотках. На моделях «гаряча пластина» та термоподразнення хвоста щурів аналгетичну активність розраховують за формулою:

$$AA = \frac{\Delta T_d - \Delta T_k}{\Delta T_k} \cdot 100\% ,$$

де AA – аналгетична активність у %;

$\Delta T_d$  – різниця у латентному періоді відповідної реакції у групі дослідних тварин до та після введення потенційного ННА;

$\Delta T_k$  – різниця у латентному періоді відповідної реакції у групі контрольних тварин до та після введення розчинника.

На моделі електричного подразнення кінцівок мишей аналгетичну активність розраховують за такою формулою:

$$AA = \frac{\Delta V_d - \Delta V_k}{\Delta V_k} \cdot 100\% ,$$

де AA – аналгетична активність у %;

$\Delta V_d$  – різниця в напрузі, що викликає відповідну реакцію у групі дослідних тварин до та після введення потенційного ННА;

$\Delta V_k$  – різниця в напрузі, що викликає відповідну реакцію у групі контрольних тварин до та після введення розчинника.

Досліджувані препарати вводять у широкому діапазоні доз, що дозволяє розрахувати за методом найменших квадратів  $ED_{50}$  та її довірчі інтервали на відповідній моделі [40, 41]. За відсутності вираженої аналгетичної ефективності розраховують  $ED_{40}$ ,  $ED_{30}$  або  $ED_{20}$ .

## 6. Поглиблене вивчення центральних механізмів аналгетичної дії ненаркотичних аналгетиків

Коли фармакологічна речовина проявляє виражені аналгетичні властивості в малих дозах (0,1–10 мг/кг) на моделях болю центрального походження, можливо зробити припущення про рецепторний механізм аналгетичного ефекту даної речовини. Для підтвердження або спростування цього положення слід вивчити вплив фармакологічних субстанцій на опіатні, адренергічні і дофамінергічні рецептори, а також можливу участь ГАМК-ергічних ланок центральної ноцицептивної системи в механізмі аналгетичної дії досліджуваних речовин.

Сучасні дані літератури свідчать про широке розповсюдження досліджень з вивчення нейрохімічних механізмів формування больового відчуття і активації процесів антиноцицепції, на основі яких склалося уявлення, що в механізмах ноцицепції та антиноцицепції суттєве значення мають опіодні і моноамінові (норадренергічні, дофамінергічні та серотонінергічні) пептидергічні та ГАМК-ергічні механізми [1, 5, 8, 24–26]. Про участь моноамінових хімічних систем в механізмах пригнічення болю свідчать такі дані: моноаміновміщуючі нейрони локалізуються у значних кількостях у структурах мозку, функція яких тісно пов'язана з ноцицепцією та антиноцицепцією [7]; міжструктурні зв'язки у головному мозку здійснюються кількома моноамінергічними шляхами; клінічні та експериментальні спостереження підтверджують суттєвий вплив на больову чутливість деяких фармакологічних препаратів, механізм дії яких пов'язаний зі зміною обміну моноамінів – катехоламінів та серотоніну.

Так, у адренопозитивного препарату клофеліну, який відноситься до гіпотензивних засобів центральної дії, був виявлений знеболюючий ефект при ноцицептивних стимулах термічної, електричної та хімічної природи. Оскільки аналгетична дія клофеліну усувається  $\alpha_2$ -адреноблокаторами, його аналгетичну дію пояснюють активацією центральних  $\alpha_2$ -адренорецепторів [46]. Вважають, що клофелін не діє через опіатні рецептори, тому що його аналгетична дія лише незначною мірою послаблюється налоксоном у великих дозах [1]. Про участь у регуляції больової чутливості  $\beta$ -адренорецепторів свідчить аналгетична дія  $\beta$ -адреноблокатора пропранололу (анаприліну) [1, 46].

При вивченні впливу на механізми ноцицепції та антиноцицепції прекурсора катехоламінів леводопа встановлена його здатність підвищувати рівень дофаміну і знижувати вміст норадреналіну в головному мозку, чим пояснюється гіперальгетична дія одного леводопа. Одночасне застосування з леводопою блокаторів ДОФА-декарбоксілази (карбідопа) сприяє кращому проникненню леводопа через гематоенцефалічний бар'єр, що призводить до значного підвищення рівня дофаміну і норадреналіну в ЦНС [46] та проявленню знеболюючої дії.

Проявляє аналгетичні властивості і блокатор дофамінових ( $D_A$ ) рецепторів аміназин. Останній сприяє пролонгації аналгетичного ефекту наркотичних та ненаркотичних аналгетиків [27, 46].

Дослідженнями останніх років встановлена аналгетична активність ГАМК-позитивних препаратів, зокрема діазепаму, який активує ГАМК-рецептори, сприяє вивільненню ГАМК та її гальмівному впливу на синаптичну передачу больових імпульсів. Діазепам підсилює дію наркотичних та ненаркотичних аналгетиків [27, 46].

### 6.1. Вивчення впливу нових ненаркотичних аналгетиків на опіатні рецептори

Вплив нових ННА на опіатні рецептори слід вивчати на моделях за участю центральних механізмів болю. До них відносяться моделі термічного («гаряча пластина») (I) і електричного подразнення (II) кінцівок мишей та термоподразнення хвоста щурів (III) [44, 45]. Як референс-препарати можна використовувати агоністи та антагоністи опіатних рецепторів, такі як морфін (агоніст  $\mu$ -рецепторів), DADL (агоніст  $\delta$ -рецепторів), кетоциклазодин (агоніст  $\chi$ -рецепторів), N-алілнорциклазодин (агоніст  $\sigma$ -рецепторів) та налоксон (антагоніст  $\mu$ -,  $\delta$ - та  $\chi$ -рецепторів) [46].

Визначення вихідного порогу больової чутливості проводять у всіх тварин під відповідним ноцицептивним впливом (металічна пластина з  $t=54,6^{\circ}\text{C}$ ; імпульсний струм з напругою від 1 до 100 В; гаряча вода з  $t=60^{\circ}\text{C}$ ). Потім дослідним групам тварин перорально або парентерально вводять досліджуваний препарат та референс-препарати в дозах, які дорівнюють  $\text{ED}_{50}$  на відповідній моделі, у вигляді водних суспензій з розрахунку: 0,2 мл суспензії на 10 г маси тіла мишей та 0,5 мл на 100 г маси тіла щурів, контрольні тварини у всіх серіях одержують перорально або парентерально еквівалентну кількість розчинника. Одна з груп дослідних тварин за 20 хв до або після введення препаратів одержує перорально або парентерально референс-препарати у вибраних для дослідження дозах.

Далі, у всіх серіях через кожні 30 хв протягом 5 год реєструють динаміку змін порогу больової чутливості в дослідних та контрольних групах тварин.

Аналгетичну активність визначають за здатністю речовин змінювати поріг больової чутливості в дослідних групах тварин порівняно з контрольною і виражають у відсотках.

Вплив нового ННА на опіатні рецептори визначають за зміною вираженості аналгетичної активності комбінації досліджуваного та референс-препарату порівняно з аналгетичним ефектом кожного препарату окремо.

### ***6.2. Вивчення можливої участі медіаторних систем у механізмі аналгетичної дії нового ненаркотичного аналгетика***

Вивчення можливої участі катехоламінергічної та ГАМК-ергічної систем в механізмі аналгетичної дії нового ННА слід проводити на моделі термічного подразнення хвоста щурів. Для вивчення впливу препарату на вивільнення дофаміну та норадреналіну в ЦНС референс-препаратом може бути комбінована лікарська форма (наприклад, наком), яка містить прекурсор дофаміну леводопу та блокатор периферичної ДОФА-декарбоксілази карбідону, що сприяє підвищенню рівня дофаміну і норадреналіну в ЦНС. Участь у механізмі аналгетичної дії дофамінових рецепторів можна вивчити за допомогою блокатора ДА-рецепторів аміназину. Вивчення участі адренергічної системи в механізмі дії нового ненаркотичного аналгетика проводять з використанням  $\alpha_2$ -адреноміметика клофеліну та  $\beta$ -адреноблокатора анаприліну. Для вивчення впливу нового препарату на ГАМК-ергічну систему рекомендується обрати ГАМК-позитивний препарат діазепам.

Після визначення вихідного порогу больової чутливості у всіх тварин їх розподіляють на групи: одна група – контрольна, якій вводять еквівалентну кількість розчинника; другій групі вводять досліджуваний препарат перорально або парентерально; частина груп одержує референс-препарати перорально або парентерально, іншим групам вводять комбінацію нового препарату в дозі  $\text{ED}_{50}$  на цій моделі та референс-препарату з інтервалом у 20 хв. При виборі доз референс-препаратів слід керуватися даними літератури [1, 2, 5, 46]. Далі в контрольній та дослідних групах тварин кожні 30 хв протягом 5 год реєструють динаміку змін порога больової чутливості. Аналгетичну активність визначають за здатністю досліджуваної речовини змінювати поріг больової чутливості в дослідних групах порівняно з контрольними і виражають у відсотках.

Вплив нового ННА на ту чи іншу ланку антиноцицептивної системи визначають за зміною вираженості аналгетичної активності комбінації досліджуваного та референс-препаратів порівняно з аналгетичним ефектом кожного препарату окремо.

### ***6.3. Вивчення можливості розвитку фізичної залежності при застосуванні досліджуваного ненаркотичного аналгетика***

Якщо встановлено вплив нового ННА на опіатні рецептори, то, як відомо, це може сприяти розвитку фізичної залежності при тривалому його застосуванні. Тому виникає необхідність вивчення можливості розвитку такої залежності.

З цією метою проводять дослідження поведінкових реакцій щурів (лінії Вістар або нелінійних) з урахуванням статевих ознак за методом «відкритого поля» (I і II) [47–49] і з використанням Y-подібного лабіринту (III) [50, 51].

Оцінка поведінкових реакцій щурів методом «відкритого поля» у динаміці при тривалому (6 міс) введенні препарату в дозах  $ED_{50}$  та  $10 ED_{50}$  (I) дозволяє визначити характер його впливу на функціональний стан ЦНС, а також по закінченні експерименту – можливий розвиток абстинентного синдрому.

У дослідженні II динаміку поведінкових реакцій щурів за методом «відкритого поля» вивчають протягом 8 днів під впливом фармакологічної субстанції, яку вводять у зростаючих дозах (від мінімальної до максимальної). Одна з груп тварин одночасно з введенням останньої дози досліджуваного препарату одержує внутрішньоочеревино ін'єкцію антагоніста опіатних рецепторів – налоксону, що дозволяє у випадку виникнення фізичної залежності викликати абстинентний синдром.

Поведінку тварин в обох дослідженнях оцінюють за загальноприйнятими поведінковими актами: руховій активності, орієнтовно-дослідницькій реакції та емоційній реактивності. З метою інтегральної оцінки поведінкових реакцій підраховують суму всіх активностей. Наявність абстинентного синдрому визначають за такими ознаками: струшування «мокрого собаки», скрегіт зубами, порушення пози, спроба втечі, пілоерекція, диспное, діарея, птоз, писк, «корчі» [48, 49].

В основі дослідження III з використанням Y-подібного лабіринту лежить реакція надання переваги розчину ННА перед розчинником, вивчення якої дозволяє виявити у нового ННА можливі первинно-підкріплюючі властивості, що характеризують здатність речовини викликати психічну залежність [50–52].

## **7. Подальші дослідження із створення нового ненаркотичного аналгетика**

Для створення ненаркотичного аналгетика необхідно вибрати фармакологічну речовину, яка відповідає фармакоеконімічним вимогам. Далі проводять доклінічне вивчення субстанції та лікарської форми нового препарату. У комплекс доклінічних досліджень включають вивчення специфічної фармакологічної активності та нешкідливості.

Для дослідження специфічних фармакологічних властивостей нового ненаркотичного аналгетика необхідно використовувати моделі та методи, які дозволяють оцінити механізми периферичної та центральної аналгетичної, протизапальної та жарознижуючої дій.

Враховуючи, що для препаратів групи ННА характерним є невибіркове пригнічення біосинтезу ПГ, необхідно вивчати можливу ульцерогенну дію та вплив нового ННА (субстанції та лікарської форми) на секреторну функцію шлунка. У процесі вивчення хронічної токсичності досліджуваних сполук необхідно звернути особливу увагу на функціональний стан нирок, печінки, кровотворної системи.

Вивчення специфічної токсичності проводять за допомогою моделей та методів, які дозволяють визначити алергізуючу дію, імунотоксичність, ембріотоксичність, гонадотоксичність, мутагенність, канцерогенність субстанції та лікарської форми нового препарату.

В процесі аналізу результатів доклінічного дослідження оцінюють ефективність, нешкідливість нового препарату та доцільність його використання у практичній медицині. Далі, науково-технічну документацію на новий ННА направляють на розгляд компетентного органу.

## Література

1. Брагин Е.О. Нейрохимические механизмы регуляции болевой чувствительности.– М.: Изд-во УДН, 1991.– 248 с.
2. Крыжановский В.Н. Генераторные механизмы центральных болевых синдромов и обезболивания // Вестн. АМН СССР.– 1980.– №9.– С. 33–37.
3. Matthews B. Peripheral and central aspects of trigeminal nociceptive systems // Phil. Trans. R. Soc. Lond.– 1985.– V.308.– P. 313–324.
4. Torebjork E. Nociceptor activation and pain // Phil. Trans. R. Soc. Lond.– 1985.– V.308.– P. 227–234.
5. Болевой синдром/Под. ред. В.А.Михайловича, Ю.Д.Игнатова.– Л.: Медицина, 1990.– 336 с.
6. Смолин Л.Н. Центральные и периферические механизмы боли при воспалении: Автореф. дис. ... д-ра биол. наук.– М., 1981.
7. Mefford I.N., Foutz A., Noyce N. et al. Distribution of norepinephrine, epinephrine, dopamine, serotonin, 3,4-dihydroxyphenilacetic acid, homovanilic acid and 5-hydroxyindole-3-acetic acid in dog brain // Brain Res.– 1982.– V.236.– P. 339–349.
8. Лисункин Ю.И., Мохорт Н.А. Фармакологическое воздействие на чувствительные нервные окончания.– К.: Здоров'я, 1991.– 200 с.
9. Ревенко С.В., Ермишкин В.В., Селектор Л.Я. Периферические механизмы ноцицепции: Сенсорные системы.– 1988.– Т.2, №2.– С. 198–210.
10. Antonello A., Tremolada C., Baggio B. et al. In vivo activation of renal phospholipase activity by BR in the rat//Prostaglandins.– 1978.– V.16, №1.– P. 23–31.
11. Bleenen T., Keele C.A. Observation on the algogenic action of adenosine compounds on the human blister bore preparation // Pain.– 1977.– V.3, №4.– P. 367–377.
12. Damas J. Inhibition du pouvoir prostaglandinolytique de la bradykinine chez le rat // C. R. Soc. Biol.– 1977.– V.171, №3.– P. 685–689.
13. Fairhurst A.S., Whittaker M. L., Ehler F.J. Interactions of D600 (methoxyverapamil) and local anesthetics with rat brain  $\beta$ -adrenergic and muscarinic receptors // Biochem. Pharmacol.– 1980.– V.29, №2.– P. 155–162.
14. Ferreira S., Nakamura M. Prostaglandin hyperalgesia: The peripheral analgesic activity of morphin, enkephalines and opioid antagonists // Prostaglandins.– 1979.– V.18, №2.– P. 191–201.
15. Hokfelt T., Ljungant A., Terrenius L. et al. Immunohistochemical analysis of peptide pathways possibly related to pain and analgesia: Enkephalin and substance P // Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.– 1977.– V.74, №7.– P. 3081–3085.
16. Lembeck F., Gamse R., Juan H. Substantia P and sensory nerve ending // Substantia P./Ed. U.S.Euler, B.Pernow.– N.Y.: Raven Press, 1977.– P. 169–181.
17. Moncada S., Mullane K.M., Vane I.R. Prostacycline-release by bradykinin in vivo // Br. J. Pharmacol.– 1979.– V.66, №1.– P. 96–97.
18. Сигидин Я.А., Шварц Г.Я., Арзамасцев А.П., Либерман С.С. Лекарственная терапия воспалительного процесса: Экспериментальная и клиническая фармакология противовоспалительных препаратов.– М.: Медицина, 1988.– 240 с.
19. Калужный Л.В. Физиологические механизмы регуляции болевой чувствительности.– М.: Медицина, 1984.– 214 с.
20. Авруцкий М.Я., Смольников П.В., Ширяев В.С. Стадол – альтернатива наркотических анальгетиков.– М.: Ультра-Мед, 1994.– 140 с.
21. Лиманский Ю.П. Физиология боли.– К.: Здоров'я, 1986.– С. 96.
22. Jensen T.S. Endogenous antinociceptive systems. Studies on spinal and supraspinal modulating mechanisms with particular reference to monoaminergic and opioid systems // Acta Neurol. Scand.– 1986.– V.74 (Suppl. 108).– P. 1–35.

23. Janss A.J., Gebhart G.F. Brainstem and spinal pathways mediating descending inhibition from the modularly lateral reticular nucleus in the rat // *Brain Res.*– 1988.– V.440.– P. 109–122.
24. Willis W.D. Nociceptive pathways: anatomy and physiology of nociceptive ascending pathways // *Phil. Trans. R. Soc. Lond.*– 1995.– V.308.– P. 253–268.
25. Fields H.L., Heinricher M.M., Anatomy and physiology of a nociceptive modulatory system // *Phil. Trans. R. Soc. Lond.*– 1995.– V.308.– P. 361–375.
26. Игнатов Ю.Д. Эндогенные болеутоляющие системы мозга и их изменения под влиянием опиатов и опиоидов//Актуальные проблемы лекарственного обезболевания.– Л., 1988.– С. 7–29.
27. Машковский М.Д. Лекарственные средства (Пособие для врачей).– В 2 частях.– М.: Медицина, 1994.– Ч.1.– 736 с.– Ч.2.– 688 с.
28. Маянский Д.Н. Хроническое воспаление.– М.: Медицина, 1991.– 272 с.
29. Тринус Ф.П., Клебанов Б.М., Ганджа И.М., Сейфулла Р.Д.. Фармакологическая регуляция воспаления.– К.: Здоров'я, 1987.– 144 с.
30. Тринус Ф.П., Бухтиарова Т.А. Фармакологический анализ участия моноаминергических систем в механизме анальгезирующего действия НПВС // *Фармакология и токсикология.*– К., 1989.– Вып.24.– С. 89–92.
31. Giacona N.S., Dahe S.L., Hare B.D. The role of NSAIDS and non-narcotics in analgesia // *Hosp. Formul.*– 1987.– V.22, №8.– P. 723–725.
32. Sacerdote P., Mouza G., Manteguzzo P. Diclofenac and piroprofen modify pituitary and hypothalamic beta-endorphin concentrations // *Pharmacol. Res. Commun.*– 1988.– V.17, №8.– P. 679.
33. Власковска М., Сурчева С., Овчаров Р. Значение эндогенных опиоидов и простагландинов в действии анальгина (метамизола) и верапамила // *Фармакол. и токсикол.*– 1989.– Т.52, №3.– С. 25–29.
34. Farrow D.C., Vaughan T.L., Hansten P.D., Stanford J.L. Use of aspirin and other nonsteroidal anti-inflammatory drugs and risk of esophageal and gastric cancer // *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.* – 1998.– V.7, №2.– P. 97–102.
35. Zupancic P., Zalar S., Uhan D. Comparative anti-inflammatory effects of two topically applied piroxicam formulations // *Acta Biol. L.*– 1989.– V.25 (Suppl.7).– P. 157–159.
36. Pollock D.M., Polakowski J.S., Wegner C.D., Opgenorth T.J. Beneficial effect of ETA receptor blockade in a rat model of radiocontrast-induced nephropathy // *Ren. Fail.*– 1997.– V.19, №6. P. 753–761.
37. Wenzell B., Miller B.V., Blume H., Leuhard G. Bioverfusbarkeit von diclofenac nach percutaner absorbtion // *Archpharm.*– 1989.– Bd.322, №10.– S. 770.
38. Машковский М.Д. Лекарственные средства.– В 2 томах.– Т.1.– Изд. 13-е, новос.– Харьков: Торсинг, 1997.– 600 с.
39. Brune K, Lanz K. Mode of action peripheral analgesic // *Arzneimittel-Forsch.* – 1984. – V.34, №9a.– P. 1060–1065.
40. Хаджай Я.И. О графическом способе определения эффективной дозы и её доверительных границ при учете реакций в градуированной форме // *Фармакол. и токсикол.* – 1968.– №1. – С. 118– 123.
41. Лакин Г.Ф. Биометрия.– М.: Высш. шк., 1990.– 352 с.
42. Яковлева Л.В. Изыскание и изучение новых нестероидных противовоспалительных средств – производных дикарбоновых кислот: Авторсф. дис. ... д-ра фармац. наук.– Купавна, 1992. – 58 с.
43. A new writhing model of factor XII activator-induced pain for assessment of non-steroidal anti-inflammatory agents. I. Kaolin-induced writhing mice/T.Fujiyoshi, M.Kuwashima etc. // *J. Pharmacobiol. Dyn.*– 1989.– V.12.– P. 132–136.
44. Методические рекомендации по экспериментальному (доклиническому) изучению нестероидных противовоспалительных фармакологических веществ (изд. официальное)/Ф.П.Тринус, Б.М.Клебанов, В.И.Кондратюк и др.– М., 1983.– 15 с.

45. Методические рекомендации по экспериментальному (доклиническому) изучению фармакологических веществ, предлагаемых в качестве нестероидных противовоспалительных средств.– К.: ФК МЗ Украины, 1994.– 40 с.
46. Нейропсихофармакология болеутоляющих средств/Под ред. проф. Ю.Д.Игнатова.– Л., 1986.– 179 с.
47. Беспалов А.Ю., Звартау Э.Э. Влияние израдипина на активированную морфином реакцию самостимуляции у крыс // Журн. высш. нервн. деятельности.– 1995.– Т.45, №1.– С. 140–144.
48. Phillips A.G., Le Piane F.G. Reinforcing effects of morphine microinjections into the ventral segmental area // Pharmacol. Biochem. Behav.– 1980.– V.12, №6.– P. 965.
49. Константинопольский М.А., Тюрина И.В., Сурикова А.А. Поведенческие методы оценки зависимости от опиатов у крыс // Матер. Всесоюзн. научн. конф. «Мед.-биол. проблемы алкоголизма» (Воронеж, 1987).– М., 1988.– С. 56.
50. Di Chiara G., North R.A. Neurobiology of opiate abuse // Trends Pharmacol. Sci.– 1992.– V.13, №5.– P. 185.
51. Bures J., Buresova O., Huston J. Techniques and basic experiments for the study of brain and behavior/N.G.– 1983.– 326 p.
52. Звартау Э.Э. Методология изучения наркотоксикомании // Итоги науки и техники. Серия наркол./ВИНИТИ.– 1988.– Т.1.– 166 с.



## ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНЕ ВИВЧЕННЯ НОВИХ ПРОТИВИРАЗКОВИХ ПРЕПАРАТІВ

Яковлєва Л.В.,  
Оболенцева Г.В.,  
Брюзгінова Л.П.

### Перелік скорочень

**ВГ** – відновлений глутатіон  
**ВІ** – виразковий індекс  
**ДК** – дієнові кон'югати  
**ЛКК** – луго-кислотний коефіцієнт  
**МДА** – малоновий діальдегід  
**ПА** – противираzkова активність  
**ПОЛ** – перекисне окислення ліпідів  
**СВ** – ступінь виразки  
**ШКТ** – шлунково-кишковий тракт  
**ШОЕ** – швидкість осідання еритроцитів

### Вступ

Експериментальне вивчення специфічної дії противираzkових засобів повинно включати не менше трьох груп досліджень:

- 1) фармакотерапевтичне вивчення досліджуваних речовин на моделях експериментальної виразки шлунка;
- 2) вивчення впливу речовин на секреторну функцію шлунка;
- 3) дослідження впливу на моторну функцію травного каналу

Такий комплекс досліджень дозволяє оцінити вплив пов'язаних речовин на основні функції шлунка, які тісно взаємопов'язані одна з одною. Відомо, що нормальний ритм евакуації вмісту шлунка в дванадцятиципалу кишку є, у свою чергу, одним із значних факторів регуляції секретії ферментів, соляної кислоти і гастродуоденальних гормонів. За умов патології (виразкова хвороба, гастрит, ентероколіт та ін.) відбувається «поломка» нормальної регуляції секреторної і рухової функції шлунка. Ці порушення можуть стати одним із патогенетичних механізмів виразкової хвороби, обумовлюючи ряд тяжких симптомів.

Оскільки засоби, що рекомендуються для лікування виразкової хвороби, можуть мати різнобічну дію, окремі види якої будуть визначати механізм загоюючого ефекту, послідовність проведення дослідження для кожного препарату визначається його переважною дією: так, для антацидних препаратів дослідження починають з вивчення впливу на секреторну функцію шлунка; для засобів, які регулюють моторику травного каналу, – з цього виду дії; для репаративів – з вивчення загоюючої дії.

Зважаючи на те, що виразкові ураження у людини локалізуються в різних відділах шлунково-кишкового тракту (ШКТ), у методичних рекомендаціях наводяться моделі, які дозволяють відтворити в експерименті виразковий коліт і проктит.

## **1. Вивчення противиразкової дії запропонованого лікарського засобу**

Пошук противиразкових засобів передбачає обов'язкове фармакотерапевтичне дослідження на моделях експериментальної виразкової хвороби у тварин. Однак різноманітність етіопатогенетичних факторів захворювання, а також належність його до антропопатології ускладнює розроблення однієї збірної моделі, яка найбільш повно відображає риси патологічного процесу. Найчастіше вдається моделювати окремі прояви захворювання, а не всю хворобу в цілому.

Існування декількох теорій патогенезу виразкової хвороби відображає різні підходи гастроентерологів до цього питання. Підсумовуючи всі відомі до теперішнього часу факти про причини виникнення і шляхи розвитку захворювання, можна визначити його як сумісне порушення нервових, гуморальних і місцевих механізмів травлення [7,13]. На думку вітчизняних і закордонних гастроентерологів, лікування виразкової хвороби повинно включати дію як на центральні механізми, що регулюють функції шлунка, так і на місцеві гастродуоденальні механізми, які визначають «стійкість» самого органу.

Фармакологічне вивчення противиразкових засобів необхідно проводити на декількох моделях патології з різним механізмом виникнення. Така точка зору висловлюється багатьма дослідниками і підтверджується аналізом вітчизняної і закордонної літератури з опису експериментального вивчення нових противиразкових препаратів.

До моделей, які використовуються, висуваються наступні вимоги:

- 1) максимальне наближення механізму виникнення експериментального виразкового процесу до етіопатогенезу клінічної форми захворювання;
- 2) надійна відтворюваність захворювання на доступних лабораторних тваринах;
- 3) відносно прості способи моделювання патології;
- 4) помірна тривалість експерименту, що дозволяє оцінити дію препарату в часі (Г.В.Оболенцева, 1983) [21].

За тривалістю досліду моделі можна охарактеризувати як «гострі» і «підгострі» або «хронічні».

### **1.1. «Гострі» ушкодження шлунка**

Вибираючи адекватні моделі патології шлунка, ми виходили із сучасної концепції етіопатогенезу виразкової хвороби, яка враховує як нервово-гуморальний (центральний), так і гастродуоденальний (місцевий) механізми. Порушення діяльності нервової системи у сфері центрального і вегетативного її відділів займає провідне положення, створюючи всі передумови для утворення виразок. Воно тісно пов'язане зі змінами в ендокринній регуляції та обміні біогенних амінів, які виконують роль медіаторів. Серед місцевих механізмів, які беруть участь у формуванні виразкового дефекту в шлунку і дванадцятипалій кишці, важлива роль належить зниженню резистентності слизової оболонки, обумовленому трофічними порушеннями й ослабленням захисного муцинового бар'єру.

Починати фармакотерапевтичне вивчення потенційних противиразкових засобів слід на одній із швидко відтворюваних моделей «гострих» виразок шлунка. Найбільш адекватними моделями виразкової хвороби шлунка вважаються такі експериментальні пошкодження шлунка, у механізмі яких провідне місце належить нейрогуморальному фактору [13]. З цих дистрофій шлунка можна рекомендувати такі моделі, які розглядають як «гострі» виразки шлунка.

**1. Рефлекторна виразка шлунка**, яка розвивається після нанесення тваринам надзвичайного подразнення на пілородуоденальну ділянку. Внаслідок цього відбувається рефлекторне збудження гіпофізарно-адреналової системи і зниження ресинтезу білка в стінці шлунка [2, 11], а також порушується тканинний енергетичний обмін [12].

Досліди проводять на щурах, морських свинках або кролях. Для досліду потрібно відбирати рівних за масою тіла тварин, які знаходяться в однакових умовах і на однаковому харчовому раціоні. Як механічний подразник застосовують стерильний кровоспинний затискач Пеана,

який накладають на дванадцятипалу кишку на 10 хв. Після зняття затискача рану пошарово зашивають. Операція проводиться в асептичних умовах під легким ефірним наркозом.

Через 24 години після травматизації дуоденальної ділянки на слизовій оболонці шлунка практично у 100% випадків виявляються виражені явища деструкції тканини: ерозії, виразки, геморагії, які розташовуються, головним чином, по вершинах складок у вигляді смужок довжиною 2–3, до 10 мм і локалізуються переважно в залозистій частині шлунка.

При мікроскопічному дослідженні виявляються характерні для деструкції явища, у деяких випадках залозисті трубки розсунуті скопиченням еритроцитів, видно лейкоцитарну інфільтрацію, яка захоплює також і м'язовий шар, котрий іноді може бути некротизованим. Тварин можна піддавати евтаназії через 24, 48 або 72 години після операції.

**2. Метод іммобілізації** щурів з подразненням віддалених від шлунка рефлексогенних зон. Досліди проводяться на щурах, які попередньо голодували протягом 24 годин. Тварин фіксують на столику в розпластаному стані за допомогою гумових шворок, якими закріплюються передні і задні кінцівки. У передні лапи вколюються голчасті електроди, які підключаються до електронного стимулятора, що генерує прямокутні імпульси постійного струму. Електростимуляція проводиться протягом 3 годин з частотою 50 Гц, тривалістю імпульсу 50 мс, напругою 5–6 В. Сумісний вплив на тварин іммобілізації і електростимуляції викликає в них стан сильного збудження, який проявляється в підвищеній агресивності і злостивості. Ця реакція може зберігатися протягом наступної доби. Через 24 години після проведених маніпуляцій щурів забивають і досліджують шлунок.

Частота розвитку деструктивних пошкоджень у стінці шлунка при цій моделі становить приблизно 80% і коливається від 98,4 до 64,3 % залежно від пори року.

Пошкодження розташовуються на вершинах складок слизової оболонки в залозистій частині шлунка і мають вигляд чорних смужок шириною 0,1–1 мм і довжиною до 10 мм.

Гістологічно цей вид пошкодження характеризується відторгненням мас некротизованого епітелію з фібринозними нашаруваннями, порушенням структури епітелію трубчастих залоз, інфільтрацією клітинними елементами. Пошкодження проникають у підслизовий шар. У зоні некрозу слизової оболонки спостерігається пухкість, набряклість, розширення судин підслизового шару, скупчення клітинних елементів. Пошкодження стінки шлунка можуть самостійно загоїтися протягом 7–10 днів.

**3.** До «гострих» експериментальних уражень шлунка належить **модель, викликана преднізолоном**. У зв'язку з низькою відтворюваністю преднізолонової моделі і слабо вираженими ерозивними змінами на слизовій оболонці запропонована модифікація цієї моделі, яка полягає в сумісному введенні преднізолону й етилового алкоголю [14].

Тварин протягом 12 годин витримують на голоді з вільним доступом до води. Після закінчення зазначеного часу щурам внутрішньошлунково вводять преднізолон з розрахунку 20 мг/кг і етиловий спирт 80 % у дозі 0,6 мл/100 г маси тіла тварини.

Преднізолон необхідно попередньо розчинити в алкоголі. Найбільш ефективна концентрація спирту 80°, що викликає дегідратацію слизової оболонки шлунка і некроз, підібрана емпірично. Використання суміші преднізолону та спирту обґрунтоване механізмом дії компонентів. Кортикостероїди інгібують біосинтез простагландинів, що призводить до підсилення впливу агресивних факторів шлункового соку [3]. За цих умов виражено проявляються ультраценогенні властивості алкоголю. Відтворюваність моделі 100%. Ураження слизової оболонки має вигляд «запаленого шлунку». Уся складчаста поверхня шлунка кровоточить. Патологія розвивається через 24 години після введення уражуючих факторів.

При патоморфологічному вивченні в слизовій оболонці шлунка виявляються проникаючі на різну глибину великі ділянки некрозу з крововиливами і відкладенням на значному протязі солянокислого гематину. У прилеглий до некрозу зоні – різке розширення капілярів і венул з лейкостазами в них. Спостерігається набряк власної пластинки слизової оболонки з крововиливами і лейкоцитарними інфільтраціями. М'язовий шар слизової оболонки рівномірно наб-

ряклий, місцями інфільтрований сегментоядерними лейкоцитами. Підслизовий шар відповідно до некрозів слизової оболонки різко набряклий з наявністю осередкових і дифузних запальних інфільтратів, представлених переважно сегментоядерними нейтрофільними лейкоцитами, дрібні артерії й артеріоли переважно звужені, ендотелій їх розташовується у вигляді «частоколу».

Поза ділянками некрозу в слизовій оболонці шлунка щурів відмічається помірне розширення шлункових ямок, виражені дистрофічні зміни покривноямоквого епітелію з різким зменшенням, аж до повного зникнення в ньому Шик-позитивного альціакофільного мукоїду. Місцями на цьому фоні в основі альвеолярного шару зустрічаються крововиливи. Структура м'язового шару стінки шлунка зберігається.

Показниками ступеня патології і, відповідно, фармакологічної активності досліджуваних лікарських препаратів можуть служити ураження слизової оболонки, виражене в балах, відсоток тварин з виразками, показник ВІ (виразковий індекс), патоморфологічні та гістохімічні дослідження.

Описана модель є короткочасною, що дозволяє вивчати тільки профілактичну дію лікарських речовин.

4. До моделей виразки шлунка, що гостро проходять, належить **серотонінова модель** [24]. Серотонін вводять підготовленим щурам внутрішньоочеревинно в дозі 30 мг/кг. Виразки розвиваються протягом 24 годин. Слизова оболонка шлунка має криваво-червоний колір. Діаметр виразок досягає 1–1,5 см. При одноразовому введенні серотоніну виразки спонтанно гоїлися протягом 48 годин. Дана модель дозволяє вивчати тільки профілактичну дію фармакологічних засобів.

З метою розширення можливостей експерименту описана методика була модифікована в більш тривалу, що дозволяє вивчати лікувальну дію досліджуваних препаратів [14]. Модифікація полягає в тому, що 0,6% розчин серотоніну вводили внутрішньоочеревинно три рази через 1 добу з розрахунку 0,5 мл на 100 г маси тіла тварин, що відповідає одноразовій дозі 30 мг/кг. На шосту добу одержували виражене ушкодження слизової оболонки шлунка, самостійне загоєння якого відбувалося протягом 6–7 днів.

5. **Гістамінова виразка шлунка.** Гістамін поряд із серотоніном є важливим регулятором функціональної активності шлунка [28] і завдяки високій біологічній активності і широкому спектру дії може розглядатися як «модулятор» інших регуляторних процесів [50]. Гістамін виконує функції медіатора парасимпатичної нервової системи: змінює кровообіг у мікросудинах і тим самим впливає на трофічні процеси в слизовій оболонці гастроуденальної системи. Гістамін є хімічним медіатором передавання імпульсів безпосередньо на секреторну клітину. При надлишковій продукції і вивільненні гістамін порушує секреторний цикл, підвищує активність кислотнопептичного фактора [6, 30]. Велике патогенетичне значення має місцеве осередкове інтрамуральне вивільнення гістаміну, при якому виникають осередки деструкції слизової оболонки шлунка. Гістамінова модель виразки шлунка у тварин дуже нагадує виразкову хворобу у людини [30, 47]. Гістологічна картина гістамінових шлунково-кишкових виразок у мурчаків подібна до виразки у людини. Виникненню гістамінових виразок в експерименті передують біохімічні зміни в стінці шлунково-кишкового тракту, пов'язані зі зниженням синтезу мукополісахаридів, і гіперплазія парієтальних клітин слизової оболонки шлунка [17, 39, 48, 49]. У великих дозах гістамін чинить ангіотоксичну дію, в якій виділяють чотири стадії [63]: ішемічну – з фокальними необоротними дегенеративними процесами в слизовій оболонці шлунка і дванадцятипалої кишки та фокальним спазмом капілярів і артеріол; стадію тимчасового відновлення кровотоку, що швидко змінюється стазом; стадію геморагічного інфаркту та остаточну стадію виразки з відторгненням геморагічної некротичної тканини.

Установлено, що вплив гістаміну на шлункову секрецію відбувається через  $H_2$ -рецептори, причому висувається гіпотеза про так звану «дозволяючу» здатність гістамінових рецепторів, які підвищують рівень збудливості ацетилхолінових і гастринових рецепторів [43].

Для одержання гістамінових виразок шлунка і дванадцятипалої кишки гістамін вводять під шкіру в дозі 5–10 мг/кг мурчакам, у яких попередньо накладений затискач або лігатура на пілородуоденальну ділянку [42]. Для захисту тварин від токсичної дії гістаміну попередньо вводять димедрол. Через 1 годину після ін'єкції тварин забивають, витягають шлунок з черевної порожнини і досліджують на наявність уражень. Одночасно можна зібрати шлунковий сік для дослідження. Гістамінова модель виразки шлунка дає можливість швидко і досить точно оцінити ефективність лікарських засобів, у механізмі дії яких має значення блокування дії кислотного-пептичного фактора – блокатори гістамінових  $H_2$ -рецепторів, антациди та ін.

**6.** Модель виразки, яка викликана *перев'язуванням воротаря та доповнюється іммобілізацією* [22, 58]. У механізмі ушкодження шлунка, що розвиваються після перев'язування воротаря, має значення вплив кислого і багатого ферментами шлункового соку [40, 58] на слизову оболонку шлунка зі зниженим енергетичним метаболізмом після попереднього дво-триденного голодування [54, 55]. Ефекти, пов'язані з механічним подразненням пілоричної зони лігатурою, не можуть призводити до порушення адаптивних процесів по гормональній осі стресу [53]. Останнє, вірогідно, обумовлює вазомоторні реакції і зміну рівня моноамінів (норадреналу, серотоніну) у головному мозку і шлунку щурів після перев'язування.

Вказане ускладнюється додатковою іммобілізацією тварин у поєднанні з голодуванням у нашому досліді. Іммобілізація проводиться протягом 2 діб напередодні перев'язування воротаря шляхом розміщення тварин у клітки-пенали, що обмежують рухи. У ці дні тварини позбавлені їжі, але одержують примусово воду 1 раз на добу по 2 мл/100 г маси тіла. Перев'язування воротаря проводять під легким ефірним наркозом. У дослід потрібно брати щурів-самців з масою тіла близько 160–180 г. На більш молодих тваринах деструкція слизової може бути виражена слабкіше. Ушкодження шлунка мають вигляд круглих дефектів з діаметром до 1 мм, ділянок ерозій (іноді досить великих, неправильної форми), дрібноточкових чи лінійних крововиливів. Ушкодження шлунка розташовуються як у передшлунку (головним чином круглі виразки), так і в залозистій його частині. Остання обставина відрізняє цю модель патології від «класичного» методу, при якому ушкодження розташовуються переважно в передшлунку [58].

Цей метод широко розповсюджений в даний час і, хоча має деякі недоліки, досить простий і зручний. До переваг методу можна віднести можливість одночасного дослідження базальної секреції шлункового соку у тварин. Метод застосовують для первинного скринінгу протизвиразкових лікарських речовин з одночасним з'ясуванням можливого впливу на секреторну функцію.

## 1.2. Субхронічні і хронічні виразки шлунка

1. Для одержання *субхронічних ерозивно-геморагічних уражень* шлунка і кишечника використовують ацетилсаліцилову кислоту. Питання про механізм впливу ацетилсаліцилової кислоти на слизову шлунка залишається суперечливим, хоча значна частина дослідників схильна у бік прямого впливу на слизову оболонку шлунка [44]. Ушкодження шлунка ацетилсаліциловою кислотою являє собою гастрит «подразнення» [32, 33]. Ці явища спричиняють фокальний некроз, який сприяє втраті захисно-бар'єрних властивостей слизової, злученню епітелію та виникненню масивних ділянок геморагічних ерозій і виразок [39]. Кислотність шлункового вмісту знижується за рахунок зворотної дифузії водневих іонів. Останнім часом надають значення пригніченню саліцилатами біосинтезу мукополісахаридів шлунка і механізмам, пов'язаним з синтезом та вивільненням простагландинів [1, 18, 32, 41, 45, 51, 62].

Експериментальну виразку, яка викликана ацетилсаліциловою кислотою, розглядають як модель хронічної виразки, що має клінічний аналог у людей, які вживають аспірин.

В експерименті використовують різні дози ацетилсаліцилової кислоти, яку вводять щурам, кролям і собакам. Нами розроблено схему введення ацетилсаліцилової кислоти, що передбачає 5-разове введення ульцерогенного агента протягом 3 діб перорально в дозі 150 мг/кг [23].

При такій постановці досліду в більшості тварин вміст шлунка являв собою масу зі згустками крові. Слизова оболонка шлунка у всіх тварин, як правило, з набряком та ділянками крововиливів. У більшості тварин виявляються ушкодження шлунка на ділянці малої кривизни, які розташовуються ближче до пілоричного відділу. Приблизно у 30% тварин зустрічаються поодинокі глибокі виразки, які кровоточать, розміром  $2 \times 3$  та  $2 \times 4$  мм<sup>2</sup>. В інших щурів ушкодження менші за величиною, але кількість їх у кожній тварини значно зростає. Виразковий індекс (ВІ) у щурів контрольних груп, яких не піддавали лікувальній дії, становить від  $2,0 \pm 0,3$  до  $3,2 \pm 0,36$ .

При гістологічному дослідженні стінки шлунка спостерігаються явища, які характерні для гострого токсичного десквамативного гастриту. У підслизовому шарі передшлунка зрідка зустрічаються осередкові лімфоїдно-гістіоцитарні інфільтрати. У слизовій оболонці залозної ділянки відзначається десквамація покривного епітелію. Численні ерозії захоплюють близько  $1/3$ – $1/2$  товщі слизової шлунка. На ділянці ерозій спостерігаються осередкові лімфоїдні інфільтрати. У підслизовому шарі кровоносні судини розширені, повнокровні, відмічається осередкова, місцями дифузна лімфоїдно-клітинна інфільтрація. Уся товща слизової оболонки гіперемійована. Власний м'язовий шар трохи розволоknений (з набряком).

На моделі виразки, яка викликана ацетилсаліциловою кислотою, гістологічну оцінку ступеня деструкції можна об'єднати з гістохімічними дослідженнями, у процесі яких визначають вміст у тканині нейтральних і кислих мукополісахаридів. Нейтральні мукополісахариди визначають за допомогою реактиву Шиффа з перйодною кислотою (Шик-реакція); кислі – реакцією Хейла з колоїдним розчином гідроокису заліза, окремо чи в комбінації з Шик-реакцією за методом Риттера та Олесона [10].

Крім того, у зв'язку з можливою участю в механізмі ульцерогенезу системи фібринолізу у тварин з виразками, які індуковані ацетилсаліциловою кислотою, можна проводити визначення рівня плазміну в тканині шлунка і фібринолітичної активності крові [15].

**2. Хронічну виразку шлунка** відтворюють за Takagi et al. (1969) [61] у модифікації А.А.Нікуліна і С.И.Буданцевой (1973) [19] на щурах масою 180–230 г, яким після попередньої лапаротомії в підсерозний шар шлунка вводять 0,05 мл 5% розчину оцтової кислоти. Виразки, які виникають внаслідок уведення оцтової кислоти, мають круглу чи овальну форму, розміри від  $1 \times 1$  до  $6 \times 8$  мм. Гістологічно вони відрізняються залученням до виразкового процесу усіх шарів шлункової стінки, відзначається ексудатія і лейкоцитарна інфільтрація слизового, підслизового і м'язового шарів шлунка поблизу виразки. Такі явища зберігаються протягом 30 діб [36]. На 40-у добу запальна реакція зменшується. На 50-у – зменшується виразковий дефект за рахунок проліферації сполучної тканини з дна виразки. Модель вважається хронічною, коли її тривалість за різними авторами, знаходиться в межах від 60 до 200 діб. Вона дає можливість досліджувати дію лікарських речовин у часі з урахуванням швидкості загоєння виразкового дефекту.

Для одержання достовірних даних, які піддаються математичній обробці, на кожну дозу досліджуваної речовини варто брати по 8–10 дрібних лабораторних тварин, кількість кролів або собак може бути зменшена. У кожній серії дослідів необхідна контрольна група тварин, які піддаються впливу тільки ульцерогенного фактора.

Наприкінці досліду тварини піддаються евтаназії хлороформом або декапітацією. Для макроскопічного обстеження шлунка на наявність ушкоджень його розрізають впродовж великої кривизни, промивають кілька разів водою і потім за допомогою лупи при яскравому освітленні ретельно обстежують усі його відділи. Для зручності можна наколотити шлунки на коркові дощечки.

Для оцінки важкості ушкодження підраховувати середню кількість усіх знайдених ознак деструкції на кожну тварину не зовсім правильно, тому що морфологічно вони дуже відрізняються. Більш точний результат можна одержати, якщо розрахувати ступінь виразкового ушкодження із застосуванням системи балів. Такий метод дозволяє врахувати всі види деструк-

ції слизової оболонки шлунка не тільки кількісно, але й якісно. Запропоновано кілька систем оцінки в балах [42, 48, 56].

Найбільш уживана така система оцінки: 0 – відсутність видимих ушкоджень; 1 – наявність набряку, чи крововиливів, 1–3 невеликих виразок; 2 – кілька (більше, ніж 3) невеликих виразок чи 1 виразка значних розмірів; 3 – виразка значних розмірів (діаметр до 4 мм); 4 – кілька великих виразок; 5 – проривна виразка.

Потім у кожній групі підраховують суму балів, з якої виводять середню арифметичну величину, яка характеризує середній ступінь виразки (СВ) у групі. Крім того, у групі розраховують виразковий індекс (ВІ). У виразковому індексі відбито як відсоток частоти тварин з виразками, так і ступінь дистрофічних порушень шлунку:

$$ВІ = \frac{\text{ступінь виразки} \cdot \% \text{ тварин з виразками}}{100}$$

Противираzkова активність (ПА) – відношення ВІ відповідної контрольної групи до ВІ групи тварин, яким вводили препарат.

3. Для вивчення можливості використання противираzkових препаратів для лікування виразкового коліту рекомендується *модель експериментального виразкового коліту* з локалізацією пошкодження у сигмоподібній кишці. Коліт індукують оцтовою кислотою за методом, описаним L.R.Fitzpatrick зі співавторами [38]. За основними гістоморфологічними і деякими біохімічними критеріями вказана модель відповідає подібному захворюванню людини. Основними позитивними властивостями моделі є простота і добра відтворюваність. Експериментальних тварин (щурів) витримують на голоді з вільним доступом до води протягом 48 годин. Потім щурів наркотизують внутрішньоочеревинним введенням барбаміду в дозі 100 мг/кг і проводять лапаротомію, на місці сполучення сліпої і товстої кишок накладають зажим. У просвіт товстої кишки вводять 0,5 мл 10% розчину оцтової кислоти і через 10 секунд – 3 см<sup>3</sup> повітря. Розріз зашивають. Дослідним тваринам препарат можна вводити як із профілактичною, так і з лікувальною метою. По закінченні експерименту тварин декапітують. Стан слизової оболонки вивчають на сегменті товстої кишки довжиною 6 см. Ступінь пошкодження оцінюють у балах за шкалою [38]:

- 0 – видимих ушкоджень немає;
- 1 – місцеве локалізоване запалення;
- 2 – значне запалення без виразок;
- 3 – запалення з однією виразкою, не довшою за 1 см;
- 4 – запалення з двома і більше виразками, меншими за 1 см;
- 5 – запалення з двома і більше виразками розмірами від 1 до 2 см на протязі досліджуваної ділянки кишки;
- 6–10 – додається 1 бал на кожний сантиметр виразкових пошкоджень після початкових 6 см.

Загальний стан тварин оцінюють за динамікою маси тіла. Кількісно цей показник виражають у відсотках зниження маси тіла протягом досліджу. Морфологічну структуру товстої кишки вивчають за допомогою мікроскопічного аналізу. Поряд з цим можна реєструвати показники перекисного окислення ліпідів (ПОЛ): малоновий діальдегід (МДА), дієнові кон'югати (ДК) і відновлений глутатіон (ВГ) у сироватці крові [8]. Показовими можуть бути деякі гематологічні дані: рівень гемоглобіну, число лейкоцитів, еритроцитів і лейкоцитарна формула.

Максимум розвитку патології у контрольних тварин спостерігається на 2–3 добу. На 7-у добу має місце зменшення інтенсивності виразкового процесу, а з 9 до 14 доби відбувається повне спонтанне загоєння виразок. Виразковий процес супроводжується падінням маси тіла і підвищенням інтенсивності процесів ПОЛ.

4. Як різновид моделі виразкового коліту можна розглядати *модель фенолового проктиту* за А.М.Ногаллером і Г.А.Трубніковим (1966) у модифікації Л.В.Яковлевої і О.С.Євдокимової (1993) [20, 37]. Експериментальним тваринам (щурам) ректально вводять фенол з розрахун-

ку 0,2 мл на 100 г маси тіла 4 рази протягом 5 днів за такою схемою: перше і друге, а також третє і четверте введення проводять з інтервалами 24 години, а між другим і третім введенням інтервал складає 48 годин. Це дозволяє одержати добре відтворені виразки слизової оболонки прямої кишки і по можливості зменшити загальнотоксичну дію фенолу.

Тяжкість ушкоджень і відповідно ефективність препарату характеризують за такими критеріями: площа некрозу в мм<sup>2</sup>, інтенсивність запалення слизової оболонки в балах, довжина ушкодженої ділянки кишки щодо всієї довжини прямої кишки в процентах, відсоток тварин з виразковими ушкодженнями в групі. Стан слизової оболонки прямої кишки в балах оцінюють за трьома параметрами: набряк, гіперемія, крововиливи. Бали залежно від виразності ознаки: 0 – відсутня, 1 – помірна, 3 – сильна. Потім бали для кожної тварини підсумовують і обчислюють середню величину в кожній групі.

Описані ушкодження прямої кишки супроводжуються зниженням рівня гемоглобіну, підвищенням ШОЕ і лейкоцитозом. Динаміка виразкового ушкодження на даній моделі має такий характер: максимум виразки спостерігається на 3 добу від дня останнього введення фенолу. На 5-у добу має місце повне спонтанне рубцювання виразок. Деякий набряк і гіперемія слизової оболонки зберігаються ще на 6–7 добу.

## 2. Вивчення впливу нового фармакологічного засобу на секреторну функцію шлунка

Вивчення впливу потенційних противиразкових засобів на секреторну функцію шлунка є обов'язковим і проводиться для з'ясування можливого механізму дії та уточнення показань до застосування. У цих дослідках вивчають вплив речовин на кислотоутворюючу, ферментотворюючу і слизоутворюючу функції шлунка.

Початкові етапи вивчення можна проводити на дрібних лабораторних тваринах – щурах і мурчаках.

**На щурах** проводяться гострі дослідження за Shay et. al. [58], а також хронічні – з накладенням фістули шлунка. В отриманих порціях соку визначають об'єм, виражаючи його в мл/100 г маси тіла, рН – електрометрично, загальну кислотність і концентрацію вільної соляної кислоти титруванням 0,02 N розчином їдкового натру за Міхаелісом, вміст пепсину за одним з прийнятих методів (Метг, Туголуков, Уголев) [28].

У дослідках на щурах можна одержати дані про вплив досліджуваної речовини як на базальну секрецію без застосування стимуляторів соковиділення, так і стимульовану гістаміном, пентагастрином та ін.

**На мурчаках** одержують дані про дію речовин на секреторну функцію шлунка, посилену гістаміном [42]. Визначення всіх показників шлункової секреції проводять так само, як і в дослідках на щурах. Обсяг секреції виражають у мл/кг.

Для оцінки кислотоутворюючої здатності шлунка обчислюють дебіт-годину вільної соляної кислоти [35], а для роздільної оцінки функцій обкладкових і додаткових клітин шлунка визначають парціальну кислоту і лужну секрецію шляхом розрахунку луго-кислотного коефіцієнту (ЛКК) [29].

Крім того, у шлунковому соку можна визначати гастромукопротеїди, концентрацію натрію і калію, вміст сіалової кислоти [15].

Більш поглиблені дослідження впливу речовин на секреторну функцію шлунка проводять на собаках, використовуючи різні методичні прийоми [3, 4, 16]. На собаках отримують дані про вплив речовин як на базальну, так і на стимульовану секрецію. Як стимулятори секреції використовують гістамін під шкіру по 0,5 мл 0,1% розчину, пентагастрин у дозі 10 мг/кг.

Застосовуючи різні стимулятори, можна одержати дані про можливі шляхи стимуляції соковиділення, а використання специфічних інгібіторів секреції (атропін, блокатори H<sub>2</sub>-рецепторів та ін.) – з'ясувати шлях пригнічення і стимулювання соковиділення.



Для речовин з виявленим *in vivo* антисекреторним ефектом слід визначити величину антацидної дії *in vitro* порівняно з відомими препаратами вікаліном, альмагелем та ін.

### 3. Вивчення впливу нового фармакологічного засобу на рухову активність травного каналу

Гладенькі м'язи травної системи виконують тонічну функцію, визначаючи об'єм шлунка і різних відділів кишечника, їх моторну діяльність, скорочення сфінктерів.

Для реєстрації моторної діяльності шлунка і кишечника запропоновано багато різних методів і способів, з яких кожний окремо не дає вичерпної інформації про характер змін, що спостерігаються [9, 25, 26]. Методологічні і методичні особливості вітчизняних досліджень у цій галузі полягають у тому, що поряд з фізіологією окремих органів травної системи постійно вивчається діяльність і регуляція цілісної системи травлення.

**1. Для оцінки моторної діяльності шлунка** найбільш простим є метод баланографічної реєстрації моторної активності [9]. Досліди проводяться на собаках. Випробувані речовини можна вводити різними шляхами.

Метод електрогастрографії, в основі якого лежить реєстрація біоелектричної активності м'язів шлунка [25, 26], застосовують у собак. Біопотенціали шлунка реєструють з поверхні тіла тварини на електрогастрографі типу ЕГСМ-4М. Диферентний електрод (+) поміщають на передній стінці живота собаки нижче мечоподібного відростка на ділянці проекції антрального відділу шлунка. Індиферентний електрод (-) – на праву голілку. Для дотримання однієї з основних умов дослідження – спокійного розслабленого стану – собак варто попередньо довгостроково привчати до необхідного положення, укладаючи їх на правий бік. Приймання їжі припиняється за 12 годин до дослідження, фоном (контролем) служить голодна перистальтика. Як харчовий подразник використовують пробний сніданок.

Досліджувані речовини можна вводити натще (вплив на голодну моторику) і після пробного сніданку (травна моторика).

При аналізі даних електрогастрографічного дослідження визначають частоту перистальтичних коливань у 1 хвилину, обчислюють абсолютні цифри біопотенціалів у мВ. Математична обробка електрогастрограми полягає в оцінюванні переважних частот і ритму біопотенціалів, амплітудному аналізі і побудові варіаційних кривих амплітуд [31]. Вірогідність отриманих результатів оцінюють за критерієм Стьюдента-Фішера.

На собаках можна використовувати третій метод визначення моторної активності шлунка – радіометричний. Принцип методу заснований на передаванні зі шлунка сигналу на зміну внутрішньопорожнинного тиску, що сприймається мініатюрним радіопередавачем (радіопілюєю тиску). Вітчизняний ендорадіозонд дозволяє вимірювати величину тиску по ходу травного каналу. Ці дослідні проводяться на вітчизняних установках «Капсула».

**2. Евакуаторну функцію шлунка і моторну активність** кишечника визначають за допомогою методу «міток». Метод «міток» полягає у введенні в травний канал барвних чи інших контрастних речовин (вугілля, кармін, кольорова гумова крихта, бусинки та ін.) і визначенні швидкості просування вмісту, що має мітку, по травному каналу [52]. За допомогою цього методу можна проводити вивчення впливу речовин на евакуаторну функцію шлунка і кишечника мишей і щурів. Найбільш часто як мітки використовують активоване вугілля [59, 60]. Інтервал між уведенням 10% вугільної суспензії (0,5 мл на мишу) і забоем тварин може варіювати від 10 до 40 хв. Також можна змінювати інтервал між уведенням випробуваної речовини і суспензії вугілля. Звичайно для речовин, що вводяться перорально, достатньо 1 години.

Змінюючи тривалість періодів між уведенням речовин і вугілля, можна визначити швидкість усмоктування речовин, швидкість евакуації зі шлунка, активність перистальтики. Крім того, використовуючи фармакологічні засоби, що розслаблюють гладеньку мускулатуру травного каналу (атропін, папаверин) чи підвищують її тонус (хлорид барію, серотонін) можна

з'ясувати деякі сторони механізму дії. Евтаназію тварин краще проводити хлороформом, тому що інші методи (зокрема, декапітація) викликають сильні судоми, що може відбитися на перистальтичній активності травного каналу.

У середньому в інтактних тварин вугілля за 10 хв просувається на 30% загальної довжини кишечника. При експозиції вугілля, що складає 40 хв, довжина частини кишечника, заповненої пофарбованим вмістом, збільшується в середньому до 60–70%.

Величини заповнення кишечника вугіллям у контрольних групах і в дослідних групах наносять на графік і визначають  $ED_{50}$  – дозу досліджуваної речовини, що зменшує (збільшує) інтенсивність перистальтики на 50%.

Для зіставлення ефектів окремих речовин розраховують у відносних величинах спазмолітичну дію за формулою:

$$\frac{(B - V) \cdot 100}{B - K},$$

де К – відсоток заповнення кишечника в інтактних мишей;

В – те ж після введення хлориду барію;

В – те ж після введення досліджуваної речовини.

Досліджувані речовини можна уводити тваринам будь-якими шляхами: усередину, під шкіру, у м'язи і т.п.

Крім того, евакуаторну функцію шлунка досліджують рентгенологічним методом.

Досліди проводять на різних лабораторних тваринах, визначаючи швидкість поступального руху рентгеноконтрастного вмісту по травному каналу.

Добре відтворюваним є метод на щурах [46]. Застосування рентгеноскопії і серійної рентгенографії дозволяє документувати етапи реєстрованого евакуаторного процесу. Ці дослідження проводять на самцях білих щурів масою 200–220 г. Як рентгеноконтрастну масу використовують 30% суспензію сірчанокислого барію, що вводиться щурам з розрахунку 0,5 мл на 100 г маси тіла. Використовують різні рентгенівські апарати при напрузі 40 кВ і силі струму 4–5 мА. Тварин поміщають на відстані 40–45 см від трубки.

Вибір доз досліджуваних препаратів залежить від їх хімічної природи. Для рослинних препаратів дози варіюють від 25 до 250 мг/кг. Якщо речовина не викликає ефекту в дозі 250 мг/кг, то подальші дослідження недоцільні.

Для речовин синтетичної природи дози можуть складати від 1 до 100 мг/кг.

У скринінгових дослідженнях вивчення речовин проводять у широкому діапазоні доз. У дослідах для оцінки активності слід застосовувати не менше двох доз.

Активним варто вважати препарат, менша доза якого має ПА – 1,5–2,0.

Активність пропонованого препарату варто порівнювати з існуючими противиразковими засобами:

– для засобів з переважним антисекреторним ефектом для порівняння використовують маалокс, вікалін, альмагель;

– для блокаторів  $H_2$ -рецепторів – циметидин, фамотидин;

– для препаратів репаративної дії – метилурацил, обліпихова олія, олія шишшини;

– для препаратів, що зміцнюють слизовий бар'єр шлунка, – денол, простанон;

– для препаратів, що усувають явища запалення і спазми, – ліквіритон, калефлон;

– для препаратів, що підсилюють секреторну функцію шлунка – плантаглюцид.

Дослідження загальної і хронічної токсичності перспективних противиразкових засобів проводять стандартними методами, що застосовуються при дослідженні нешкідливості фармакологічних речовин різної специфіки.

## Література

1. Ажгихин И.С. Технология лекарств.– М.: Медицина, 2–е изд., 1980.– 440 с.
2. Аничков С.В., Заводская И.С. Некоторые итоги работ по фармакологии нейрогенных дистрофий//Нервная трофика в физиол. и патол.– М.: Медицина, 1970.– С. 83–90.
3. Белоусов А.С. Радиотелеметрическое исследование некоторых функций пищеварительного тракта человека: Дис... д-ра мед. наук.– М., 1965.
4. Белоусов А.С. Современные взгляды на лечение язвенной болезни//Терапевт. арх.– 1973.– №4.– С. 75–81.
5. Богер М.М. Язвенная болезнь.– Новосибирск: Наука, 1986.– 254 с.
6. Быстров В.Н., Чернин В.В., Шабанов А.М. О роли гистамина в ulcerogенезе//Пат.физиол. и экспер. терапия, 1980.– Деп. ВНИИТИ, № 1366–80.– 12 с.
7. Василенко В.Х., Цодиков Г.В. О полипотентности действия салицилатов.– К.: Медицина, 1979.– №4.– С. 14–23.
8. Владимиров Ю.А., Арчаков А.И. Перекисное окисление липидов в биологических мембранах.– М.: Наука, 1972.
9. Гальперин Ю.М., Роганский Г.Г. Взаимоотношения моторной и эвакуаторной функций кишечника.– М.: Наука, 1971.– 128 с.
10. Елисеев В.Г., Субботин М.Я., Афанасьева Ю.И. и др. Основы гистологии и гистологической техники.– М.: Медицина, 1967.– 238 с.
11. Заводская И.С. Механизм образования экспериментальных язв желудка, вызванных нанесением чрезвычайного раздражения на область двенадцатиперстной кишки//Фармакол. и токсикол.– 1955.– №2.– С. 37–41.
12. Заводская И.С., Мигас Э.А. Изменения содержания нуклеиновых кислот и цАМФ при нейрогенных дистрофиях желудка//Бюлл. эксперим. биол. и мед.– 1978.– №4.– С. 405–407.
13. Заводская И.С., Морева Е.В. Фармакологический анализ механизма стресса и его последствий.– Л.: Медицина, 1981.– 216 с.
14. Зупанец И.А. Отчет по НИР(заключительный) «Изучение специфической активности противоязвенного препарата примамета и специфической антианемической активности таблеток «Феррокаль».– науч. рук. Л.В.Яковлева, № гос.регистрац. 01880011098, Харьков, 1990.– 82 с.
15. Лабораторные методы исследования в клинике. Справочник/Меньшиков В.В., Делекторская Л.Н., Золотницкая Р.П. и др.: Под ред. В.В.Меньшикова. - М.: Медицина, 1987. - 368 с.
16. Липар Е.Ю. Кислотообразовательная функция желудка в норме и патологии.– Рига: Зинатне, 1968.– 438 с.
17. Липовский С.М. О моделировании язвенной болезни в эксперименте//Новые методы исследования в гастроэнтерологии.– Новосибирск, 1969.– С. 255–257.
18. Машковский М.Д. Простагландины (обзор литературы)//Фармакол. и токсикол.– 1974.– №1.– С. 109–116.
19. Никулин А.А., Буданцева С.И., Горин А.Г. и др. Лечение длительно незаживающих язв желудка у крыс некоторыми новыми препаратами//I Всес. съезд гастроэнтерол.: Тез. докл.– М., 1973. - С. 136.
20. Ногаллер А.М., Трубников Г.А. Значение тканевой аутоаллергии при неспецифическом язвенном колите//Пробл. гастроэнтерол. Вып.1.– Душанбе, 1966.– С. 39–51.
21. Оболенцева Г.В. Влияние качества сырья на биологическую активность готового препарата при промышленном производстве плантаглюцида//Всесоюз. науч. конф. «Основные направления работы по улучшению качества лекарственных средств»: Тез. докл.– Харьков, 1983.– Ч.2.– С. 86–88.
22. Оболенцева Г.В., Хаджай Я.И. О влиянии некоторых природных полисахаридов на дистрофические процессы в желудке//Респ. конф. «Фармакологическая регуляция обменных процессов»: Тез. докл.– Л., 1972.– С. 121–122.

23. Оболенцева Г.В., Хаджай Я.И., Видюкова А.И. и др. Влияние некоторых природных веществ на язвенное поражение желудка крыс, вызванное ацетилсалициловой кислотой//Бюлл. exper. биол. и мед. – 1974.– Т.77, №3.– С. 39–41.
24. Скляр Я.П. Желудочная секреция.– Киев: Гос. мед. изд-во УССР, 1954.– С.74–77.
25. Собакин М.А. Моторная деятельность желудка при пищеварении: Дисс.... д-ра мед. наук.– М., 1966.
26. Собакин М.А. Экспериментальная методика электрографического исследования моторной деятельности желудка при пищеварении. Сообщение 1//Бюлл. эксперим. биол. и мед.– 1953.– №9.– С. 76–79.
27. Современные методы в биохимии.– М.: Медицина, 1977.– С. 3–64, 66–68.
28. Туголуков В.Н., Гроховский Л.П., Можайская Н.М. Роль биогенных аминов в патогенезе и клинике язвенной болезни//Матер. I Всесоюз. съезда гастроэнтерол.– М., 1973.– С. 156.
29. Фишзон-Рысс Ю.И. Современные методы исследования желудочной секреции.– Л.: Медицина, 1972.– С. 247.
30. Хамори А. Этиология и патогенез пептической язвы//Венгерск. фармакотерапия.– 1970.– №1.– С. 3–15.
31. Циммерман Я.С., Бяков Ю.А., Черников З.В. Методика элементарного математического анализа электромиограмм желудка человека//Диагностика, клиника и лечение заболеваний желудка/Под ред. Г.А.Вагнера.– Пермь, 1972.– С. 191–197.
32. Цодиков Г.В., Клименко В.В., Лазькова С.Н. Пролиферативная активность поверхностного ямочного эпителия желудка при его повреждении ацетилсалициловой кислотой//Бюлл. эксперим. биол. и мед.– 1979.– №12.– С. 733–736.
33. Цодиков Г.В., Толмачев Ю.П., Денисов Л.Н. Изменение слизистого барьера желудка человека при воздействии на него аспирина и индометацина//Актуальные вопр. гастроэнтерол.– М., 1972.– №5.– С. 119–148.
34. Чернух А.М., Александров П.Н., Алексеев О.В. Микроциркуляция.– М.: Медицина, 1975.– С. 455.
35. Шилов П.И., Фишзон-Рысс Ю.И. Изучение кислотообразующей функции желудка по показателям дебит-часа и концентрации свободной соляной кислоты//Клин. мед.– 1962.– №7.– С. 87.
36. Яковлева Л.В. Отчет о НИР (заключительный) «Изучение специфической активности противоязвенного препарата примамета и специфической антианемической активности таблеток «Феррокаль»– № гос.регр. 01880011098, Харьков, 1990.– 82 с.
37. Яковлева Л.В., Евдокимова О.С. Альтан – новый препарат для лечения язвенной болезни желудочно-кишечного тракта (на укр. яз.)//Вестн. фармации.– 1993.– №1–2.– С. 96–103.
38. Fitzpatrick L.R., Bostwick G.S., Henzetti M. et al. Anti-inflammatory effects of various drugs on acetic acid induced colitis in rats//Agents and Action.– 1990.– V.30, №3–4.
39. Anderson W., Soman P.D. Degraded carrageenan and experimental acute gastric ulceration in the guinea pig//Nature.– V.199, №4891.– P. 389–390.
40. Antonsen S. Some quaternary, non-anticholinergic compounds with an inhibitory action on «shay rats» //Acta pharmacol. et toxicol.– 1965.– V.23.– P. 154–164.
41. Azuumi Y., Ochara S., Ishihara K. et al. Correlation of quantitative changes of gastric mucosal glycoproteins with aspirin-induced gastric damage in rats//Gut.– 1980.– V.21, №6.– P. 533–536.
42. Anderson W., Soman P.D. Histamin gastric ulceration in the guinea pig. Some observation on a new method//J. Pharm. Pharmacol.– 1965.– V.17, №2.– P. 92–97.
43. Bertaccini G. Бертачини Дж. H<sub>2</sub>-рецепторы гистамина и желудочная секреция//Желудочно-кишечные гормоны и патология пищеварительной системы/Пер. с англ. под ред. М.Гроссмана.– М.: Медицина, 1981.– С. 70–75.
44. Dagle G.E., Brodie D.A., Bauer B.G. Comparison of gross and microscopic gastric lesions produced in rats after single doses of Aspirin and 2-Desoxyguicjse//Toxicol. and Appl. Pharmacol.– 1970.– V.16, №3.– P. 638–645.

45. Ezer E., Szporny L. Prevention of experimental gastric ulcer in rats by a substances which increases biosynthesis of acid Mucopolysaccharides//J. Pharm. Pharmacol.– 1970.– V.22, №2.– P. 143–159.
46. Formanek K., Weize W. Zuy pharmacologie des 1-nicotinamino-1,2-diphenylaenthan//Wien. Med. Wochenschr.– 1955.– Bd.105, №18.– S. 366–368.
47. Hay L.J., Varco R.L., Cjde C.F. et al. Experimental production of gastric and duodenal ulcer in laboratory animals by intramucosal injection of Histamine in beeswax//Surg. Gynecol. Obstet.– 1942.– V.75.– P. 170–182.
48. Hakkinen J., Hartiala K. The effect of cinchophen o the acid polysaccharides of the gastric and duodenal wall in dog//Acta Physiol. Scand.– 1966.– V.66, №3.– P. 326–336.
49. Hohnke L.A. Gastric acid secretion and ulcerogenesis in histamine treated guinea pigs//Gastroenterol.– 1974.– V.66, №6.– P. 1161–1167.
50. Konturek S. Effect of secretin and jejunal acisification on gastric acid and pancreatic secretion in man//Gut.– 1970.– V.11.– P. 158–160.
51. Kocsis J.J., Harnandovich J., Silver M.J. et al. Duration of inhibition of pklatelet prostaglandin formation and aggregation by ingected aspirin or indomethacin//Prostaglandins.– 1973.– V.3, №2.– P. 141–144.
52. Koopman G.P., Kennis H.M. Two methods to assess the gastrointestinal transit-time in mice//Z. Vercuchstierk.– 1977.– Bd. 19, №5.– S. 298–303.
53. Lambling A., Hardouin J.P., Bonfils S. et al. Ulcera gastrique experimental//Arch. App. Dig. Nurr.– 1953.– V.42.– P. 417–451.
54. Mengey R., Masters Y.F. Mechanism of stress ulcer. III. Effects of hemorrhagic shock on energy metabolism in the mucosa of the antrum, corpus and fundus of the rabbit stomach//Gastroenterol.– 1974.– V.66, №6.– P. 1168–1176.
55. Mengey R., Masters Y.F. Mechanism of stress ulcer. IV. Influence of fasting on the tolerant of gastric mucosal energy metabolism to ichemia and on the incidence of stress ulceration//Gastroenterol.– 1974.– V.66, №6.– P. 1177–1186.
56. Marazzi-Uberti E., Turda C. The experimental gastric ulcer from histamine in guinea pigs. Rept. II. Methodology for biologically controlling the antiulcer activity of drugs//Med. expt.– 1961.– V.7, №1.– P. 9–14.
57. Naranjo P., Hidalgo G., Banda-Naranjo E. Art sitz des experimentellen Magengeschwurs und antiulcerose Aktivitat verschie-dener Arzneimittel//Arzneimitt. Forsch.– 1961.– №7.– S. 662–664.
58. Shay H., Komarow S.A., Siple H. et al. A evaluation of some antacid and antipeptic agents in the prevention of gastrio ulceration in the rat//Am. J. Dig. Dis.– 1947.– V.14.– P. 99–103.
59. Stickney J.C., Van Lierc E.J., Narthup D.W. Correlation between progressive motility and length of the small intenstine in albino rats and dogs //Am. J. Physiol.– 1951.– V.167, №2.– P. 390–402.
60. Setnikar I., Ravasi M.T. Da Re P. /3-methyl-6-(N-diethyl-ami-nomehtyl)-flavone – a new smooth msole relaxant//Arzneimittel-Forsch.– 1959.– №9.– S. 693–697.
61. Takagi K., Yano Sh. Effect of anti-ulcer drugs on gastric mucous hexosamine in subjected to several ulcerogenic conditions//Chem. and Pharm. Bull.– 1972.– V.20, №6.– P. 1170–1174.
62. Vanc J.R. Prostaglandins and aspirin-like drugs//Parmacol. and Future Man.– V.5.– Basel c.a., 1973.– P. 352–378.
63. Watt J., Marcus R. Ulcerative colitis in rabbits fed degraded carrageenan//J. Pharm. Pharmacol.– 1970.– V.22, №2.– P. 130–131.

## ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНЕ ВИВЧЕННЯ ЖОВЧОГІННОЇ, ХОЛЕСПАЗМОЛІТИЧНОЇ, ХОЛЕЛІТІАЗНОЇ ТА ГЕПАТОПРОТЕКТОРНОЇ АКТИВНОСТІ НОВИХ ЛІКАРСЬКИХ ЗАСОБІВ

Дроговоз С.М.,  
Губський Ю.І.,  
Скакуп М.П.,  
Коваленко В.М.,  
Деримелвідь Л.В.

### Перелік скорочень

**АлАТ** - аланінамінотрансфераза  
**АсАТ** – аспаратамінотрансфераза  
**БАР** – біологічно активні речовини  
**БСФ** – бромсульфалеїн  
**БТЛ** – бласттрансформування лімфоцитів  
**ВРО** – вільнорадикальне окислення  
**ГПЛ** – гідроперекиси ліпідів  
**γ-ГТ** – γ-глутамілтранспептидаза  
**ДК** – дієсні кон'югати;  
**ЕД** – ефективна доза  
**ЛД** – летальна доза  
**ЛДГ** – лактатдегідрогеназа  
**ЛФ** – лужна фосфатаза  
**ПОЛ** – перекисне окислення ліпідів  
**ТБК** – тіобарбітурова кислота  
**ФГА** – фітогемаглютинін  
**ХЕ** – холінестераза  
**ХХК** – холато-холестероловий коефіцієнт

### Вступ

Проблема створення високоефективних лікарських засобів для лікування та профілактики захворювань органів гепатобіліарної системи актуальна, оскільки, незважаючи на численні експериментальні дослідження та цілеспрямований пошук біологічно активних речовин, здатних коригувати гомеостаз печінки, у клініці практично відсутні ефективні вітчизняні препарати гепатозахисної дії, а асортимент жовчогінних засобів дуже обмежений. Успіху розробки та створення зазначених препаратів значною мірою сприяє наявність інформативних і доступних методів доклінічного вивчення БАР, які включають дослідження як

за умов фізіологічної норми, так і експериментальної патології печінки та жовчовивідних шляхів.

При вивченні механізмів специфічної дії потенційних гепатопротекторів особливо гостро постає питання критеріальної значущості обраного показника. Тому представлений на вибір дослідника набір методів залежно від особливостей структури та походження досліджуваних речовин (синтетичні, природні), глибини проведення дослідження, механізму специфічної активності і диференціації їхнього практичного застосування за різного ступеня ушкодження печінки та показань до застосування може бути розширений.

## 1. Скринінг жовчогінної активності біологічно активних речовин на інтактних тваринах

Здатність печінки до жовчоутворення – одна з майже 500 її метаболічних функцій – є специфічною властивістю цього органу. Тонкий механізм секреції жовчі включає утворення і виділення жовчних кислот, білірубину, холестеролу, фосфоліпідів, води та інших компонентів жовчі. Їх співвідношення складас специфічний макромолекулярний комплекс або жовчну міцелу, фізіологічна повноцінність якої значною мірою визначає основні функції печінки.

### Вивчення жовчогінної активності на мишах

Жовчогінну активність БАР визначають на інтактних мишах масою 18–20 г будь-якої статі. Тварин за 24 год до початку досліду позбавляють їжі. Досліджуваний фармакологічний препарат вводять парентерально або внутрішньошлунково (в залежності від розчинності і мети фармакотерапії) у трьох-чотирьох дозах. При цьому, якщо досліджувана БАР синтетичного походження, то дози, які використовуються, повинні включати еквімолярну дозу препарату порівняння синтетичного походження; якщо БАР має рослинне походження – ізоєфективну дозу еталонного препарату. Через 30, 60, 90, 120, 180 хв під легким ефірним наркозом мишей декапітують, роблять розтин черевної порожнини, оголюють печінку і шовковою ниткою перев'язують жовчні протоки [1]. Обережно відгинають жовчний міхур від жовчних протоків, виймають його з черевної порожнини та зважують на торсійних вагах. Після цього видаляють жовч, що міститься в ньому, жовчний міхур промивають у дистильованій воді, висушують на паперовому фільтрі і знову зважують. За різницею маси встановлюють масу жовчі в жовчних міхурах дослідних і контрольних мишей.

У середньому нормальний вміст жовчі у здорових мишей становить  $9,0 \pm 0,3$  мг [1].

За одержаними результатами із застосуванням графічного методу Я.І.Хаджая [2] розраховують середньоєфективну дозу ( $ED_{50}$ ) жовчогінної дії БАР.

Жовчогінну дію БАР, що досліджують, порівнюють з такою для еталонного препарату. При цьому вибір препарату порівняння визначається походженням (синтетичне чи природне) досліджуваної БАР. У першому випадку препаратом порівняння може бути оксафенамід, у другому – фламін, холосас, алохол, холензим.

Таблиця 1

### Жовчогінна активність еталонних препаратів

Назва препарату	$ED_{30}$ , мг/кг	$ED_{50}$ , мг/кг	$LD_{50}$ , г/кг
Оксафенамід	–	$150,0 \pm 3,78$	4,5
Фламін	$500,0 \pm 17,8$	–	> 5,0
Холосас	–	$0,25 \pm 0,03$	> 5,0
Аллохол	–	$80,0 \pm 2,46$	> 5,0

Примітка: при укладенні таблиці використано власні експериментальні дані авторів.

### Вивчення жовчогінної активності на щурах

Тварин за 24 год до початку досліду позбавляють їжі. Наступного дня їм під барбаміловим наркозом (80 мг/кг маси тіла внутрішньоочередово у вигляді 1% водного розчину) розтинають черевну порожнину, у загальну жовчну протоку вставляють поліетиленову канюлю діаметром 1 мм, черевну порожнину зашивають, канюлю виводять у пробірку, з якої жовч збирають і розраховують її кількість щогодини. Після визначення фонові швидкості секреції жовчі протягом 1 год у дванадцятипалу кишку вводять досліджуваній препарат у вигляді розчину або суспензії з додаванням 1–2 крапель твіну-80 (якщо речовина нерозчинна у воді). Досліджувані дози визначають аналогічно скринінгу на мишах. Кількість жовчі визначають протягом 3–6 год (до повного припинення стимулюючого ефекту препарату). Порівнюють швидкість фонові секреції протягом першої години із секрецією жовчі упродовж досліду після інтрадуоденального введення БАР, а також після введення однакового об'єму води з додаванням 1–2 крапель твіну, оскільки швидкість жовчогону протягом досліду прогресивно падає через зменшення пулу жовчних кислот при втраті жовчі тваринами.

Для вивчення жовчогінної активності сполук, що пропонуються для використання у педіатрії, а отже, досліджуються на молодих тваринах з тонкими жовчними протоками, канюлю вводять не в жовчну протоку, а в мішок, утворений оперативним методом з дванадцятипалої кишки. При цьому лігатурами відділяють ділянку дванадцятипалої кишки, перетинаючи її після виходу із шлунка на 0,5–1,0 см нижче місця впадання загальної жовчної протоки. Проксимальний відділ одержаної ділянки кишки перев'язують, а в дистальному – фіксують канюлю для збору жовчі.

Жовчогінну активність оцінюють за швидкістю її секреції протягом 60 хв (мг/хв/100 г маси тварини), а також за загальною масою жовчі, що виділилась протягом досліду (мг/100 г маси тіла).

### Визначення вмісту жовчних кислот та холестеролу

Необхідно пам'ятати, що істинним холеретиком є речовина, яка збільшує не лише об'єм жовчі, що виділяється за одиницю часу, але й вміст у ній жовчних кислот. Крім того, необхідно оцінювати вплив досліджуваної БАР на літогенні властивості жовчі шляхом розрахунку ХХК:

$$\text{ХХК} = \frac{\text{Холати, мг \%}}{\text{Холестерол, мг \%}}$$

Для визначення вмісту холатів і холестеролу у виділеній жовчі використовують метод, що ґрунтується на здатності охолодженого розчину заліза хлорного давати забарвлені комплекси з жовчними кислотами і холестеролом [3]. При цьому утворюються продукти з максимумами поглинання при різній довжині хвилі.

Жовч розводять етанолом (96°) у 20 разів. Центрифугують 5 хв при 1500 об./хв, до 0,1 мл на досаду додають 3,5 мл 0,1% розчину заліза хлорного в льодяній оцтовій кислоті, який попередньо на холоді змішують з концентрованою сірчаною кислотою у співвідношенні 1:1.

На 20-ій хв від початку реакції визначають оптичну густину продукту реакції з холестеролом при довжині хвилі 480 нм.

На 30-й хв суміш поміщують у водяний термостат при 37°С на 20 хв і визначають оптичну густину жовчних кислот при довжині хвилі 385 нм. Як розчин порівняння використовують робочий розчин 0,1% заліза хлорного.

Вміст жовчних кислот (мг/%) визначається за формулою:

$$C_{\text{жк}} = 114 \cdot D_{385} \cdot P,$$

де:  $C_{\text{жк}}$  – вміст жовчних кислот (мг/%)

$D_{385}$  – величина оптичної густини розчину при 385 нм;

$P$  – розведення жовчі.



Вміст холестеролу (мг/%) розраховують:

$$C_{\text{хст}} = 50 \cdot (D_{480} - 0,04D_{385}) \cdot P,$$

де:  $C_{\text{хст}}$  – вміст холестеролу (мг/%);

$D_{385}$  – величина оптичної густини розчину при 385 нм;

$D_{480}$  – величина оптичної густини розчину при 480 нм;

$P$  – розведення жовчі.

Вміст жовчних кислот у жовчі щурів у нормі становить  $1640,0 \pm 14,4$  мг/%, холестеролу –  $15,8 \pm 1,30$  мг/% [4].

## 2. Поглиблене вивчення жовчогінної активності біологічно активних речовин

Якщо у ході скринінгових досліджень виявлено, що жовчогінна активність досліджуваної БАР перевищує дію препарату порівняння, проводять поглиблене вивчення її впливу на жовчоутворюючу функцію за умов гострого холестаза та у хронічних дослідках.

При цьому тварини контрольної і дослідної груп перебувають на раціоні харчування відповідної температури, збалансованому за складом, з якого виключені компоненти, здатні стимулювати жовчну секрецію (овочі, білий хліб, молоко).

### Вивчення жовчогінної активності за умов модельного холестаза

Досить адекватною моделлю холестаза є токсичне ураження печінки селективним гепатотоксином – тетрахлорметаном. Гостра жирова і білкова дистрофія печінки, що розвивається при цьому, супроводжується дезінтеграцією ферментних процесів, цитолізом і пригніченням біоенергетики клітини. Внаслідок порушень з боку ендоплазматичного ретикулума гепатоцитів зменшується інтенсивність синтезу жовчних кислот [5], що супроводжується холестазом.

Тетрахлорметановий гепатозо-гепатит відтворюють на білих щурах шляхом підшкірного введення 50% олійного розчину тетрахлорметану з розрахунку 0,8 мл/100 г маси тварини, один раз на добу протягом 2 діб. Досліджувану речовину у дозі  $ED_{50}$ , встановленій в ході скринінгу, вводять щоденно внутрішньошлунково за 2 год до або через 2 год після введення гепатотоксину (залежно від того, профілактична чи лікувальна жовчогінна дія БАР вивчається).

Через 24 год після останнього введення тетрахлорметану у наркотизованих щурів після канюлювання загальної жовчної протоки визначають швидкість секреції жовчі (розд. 1).

Іншою легко відтворюваною моделлю холестаза є гостра ішемія печінки. Відомо, що гіпоксія, яка розвивається при гепатитах, є одним з патогенетичних факторів порушення жовчодинаміки [6], оскільки печінка посідає друге місце після мозку за чутливістю до гіпоксії.

Гостру ішемію печінки моделюють на попередньо наркотизованих барбамілом щурах (80 мг/кг маси тіла внутрішньоочередово у вигляді 1% водного розчину) шляхом накладання лігатури на судинну ніжку печінкової дольки на 15, 30, 60, 120 хв. Потім лігатуру розсікають, канюлюють загальну жовчну протоку і визначають швидкість секреції жовчі протягом 3–5 год у мг/хв/100 г маси тіла.

Досліджуваний препарат вводять внутрішньошлунково, за 2 год до моделювання гострої ішемії та інтрадуоденально в гострому досліді, в дозі  $ED_{50}$ , встановленій в ході скринінгу. Висновок про наявність жовчогінної активності БАР при модельному холестазі роблять на основі даних швидкості секреції жовчі і вмісту в ній жовчних кислот. Пріоритетність досліджуваної БАР визначають шляхом порівняння з еталонними препаратами (табл. 1), застосовуючи принцип вибору препарату порівняння, використаний у скринінгових дослідженнях (розд. 1).

### Вивчення жовчогінної активності у хронічному досліді

Дослідження жовчогінної активності БАР проводять на собаках. З цією метою на загальній жовчній протоці, відступаючи проксимально на 0,5–1,5 см від місця, де вона впадає у дванадцятипалу кишку, роблять повздовжній розріз, який складає 2/3 довжини горизонтальної частини канюлі і вводять Т-подібну фторопластову канюлю з внутрішнім діаметром 1,5 мм і зовнішнім – 2–3 мм. Її фіксують і додатково герметизують розріз вільним краєм великого сальника. У вертикальний кінець канюлі вставляють трубку з поліхлорвінілу, вільний кінець якої виводять на передню черевну стінку і приєднують до фістульної трубки з фторопласту. Поза дослідом отвір фістульної трубки закривають заглушкою, під час досліду її знімають, і жовч потрапляє назовні.

Досліджуваний препарат вводять протягом 7–10 діб парентерально або ентерально шляхом природного згодовування з їжею в ЕД<sub>50</sub>, встановленій у ході скринінгових досліджень.

Виділену через фістульну трубку жовч збирають і щодня визначають її кількість в динаміці введення препарату. Про наявність жовчогінної активності досліджуваної БАР роблять висновки за збільшенням інтенсивності секреції жовчі, викликаной дією речовини.

Визначену жовчогінну активність порівнюють з такою для препарату порівняння, яким може бути один із засобів, наведених в табл. 1, після встановлення у нього ЕД<sub>50</sub> на собаках. У порціях жовчі визначають вміст білірубину, холатів, холестеролу та значення ХХК.

Для визначення білірубину у жовчі можна використовувати метод Ван дер Берга в модифікації Н.П.Скакуна [7]. Нормальний вміст білірубину в жовчі шурів – 3,42±0,34 ммоль/л [7].

### Тонкошарова хроматографія жовчних кислот

Вивчення фракційного складу жовчних кислот дозволяє більш достовірно оцінити ступінь порушення жовчосекреторної функції печінки та ефективність корекції її за допомогою лікарських засобів.

Тонкошарову хроматографію жовчних кислот здійснюють з використанням пластин широкпористого силікагелю. Розгонку проводять у спеціально підібраній системі розчинників: хлороформ, метанол, льодяна оцтова кислота для холієвої і дезоксихолієвої кислот (вільні жовчні кислоти), у співвідношенні – 25:4:0,5; для таурохолієвої і глікохолієвої кислот (зв'язані жовчні кислоти) – 35:25:0,5. На лінію старту наносять 0,05 мл жовчі, розведеної етанолом у співвідношенні 1:5, та 0,05 мл 3% спиртового розчину стандарту жовчної кислоти. Жовчні кислоти розділяють протягом 20 хв. Зону старту фіксують в ультрафіолетовому світлі після попереднього проявлення насиченим хлороформним розчином сурми з наступним нагріванням при температурі 120°C. При цьому пластину стандарту порівнюють із пластиною розгонки жовчі і відмічають зону відповідної жовчної кислоти.

Елюювання розділених на силікагелі жовчних кислот проводять етанолом 96° з наступним центрифугуванням і випарюванням у роторному випарнику. Із сухим залишком проводять реакцію Паттенкофера, додаючи 0,4 мл 2% розчину сахарози та 5 мл 0,7% розчину сірчаної кислоти. Суміш залишають у термостаті при температурі 60°C суворо за секундоміром протягом 15 хв. Після охолодження утворений забарвлений комплекс колориметрують при довжині хвилі для холієвої, таурохолевої, глікохолевої кислот – 582 нм, а дезоксихолевої – 540 нм. Кількість жовчної кислоти визначають за калібровочним графіком і розраховують за формулою:

$$C = \frac{5A}{0,05 \cdot 10} \cdot 5 \cdot K,$$

де: С – концентрація жовчних кислот у г %;

5А – кількість жовчних кислот в аліквоті (0,01 мл жовчі), що визначається за калібрувальним графіком (у мкг) у перерахунку на загальну кількість жовчі, взятої для аналізу;

К – коефіцієнт незворотної втрати жовчної кислоти на силуфолі, становить для:  
– холевої – 2,31;

- дезоксихолевої – 2,35;
- глікохолевої – 2,67;
- таурохолевої – 2,13.

Як правило, вміст окремих жовчних кислот у жовчі собак у розрахунку на мг% становить: таурохолевої –  $2159,5 \pm 122,5$ ; холевої –  $80,0 \pm 13,0$ ; дезоксихолевої –  $200,0 \pm 0,40$ . У жовчі щурів містяться кислоти: таурохолева –  $862,2 \pm 1,9$ ; глікохолева –  $11,3 \pm 0,028$ ; дезоксихолева –  $65,3 \pm 0,163$ .

### 3. Вивчення холеспазмолітичної дії біологічно активних речовин

Лікарські засоби, які застосовуються для усунення спазму жовчовивідних шляхів, через відсутність вибіркової дії мають численні побічні ефекти, що вимагає створення нових засобів із селективною холеспазмолітичною дією.

#### Скринінг БАР щодо виявлення холеспазмолітичної дії

Вивчення холеспазмолітичної дії БАР проводять на мурчаках, яким внутрішньовенно або внутрішньом'язово вводять до 2,5 мл 0,01% розчину барію хлориду, що призводить до зниження відтоку жовчі на 50%. За 24 год до початку досліду тварин позбавляють їжі.

Під ефірним наркозом у загальну жовчну протоку мурчака вводять канюлю і вимірюють кількість жовчі протягом 5 хв. Потім роблять ін'єкцію барію хлориду у вищезазначеній дозі. На фоні холеспазму досліджують активність БАР, взятої у 3–4 дозах, вводючи її в дванадцятипалу кишку. Ефективність досліджуваних речовин визначають через 15 хв після введення БАР. Холеспазмолітичну активність оцінюють за  $ED_{50}$ , порівнюючи її з  $ED_{50}$  для міотропних спазмолітиків, папаверину, но-шпи, платифіліну (для синтетичних БАР), або флакуміну, конвафлавіну (для препаратів рослинного походження).

#### Поглиблене вивчення холеспазмолітичної дії БАР при модельному холециститі на мурчаках

Мурчакам під наркозом канюлюють загальну жовчну протоку. Як речовини, що викликають спазм жовчовивідних шляхів, використовують барію хлорид, ацетилхолін, неостигміну метилсульфат, цілокарпін, пітуїтрин, гістамін, які у відповідних розведеннях: барію хлорид – 1:10000, гістамін – 1:250000, ацетилхолін – 1:200000, вводять внутрішньом'язово, внутрішньовенно або до жовчного міхура. Після введення вказаних речовин з'єднують канюлю з пробіркою і реєструють кількість жовчі, виділеної через кожні 10 хв досліду. Для вивчення профілактичної дії досліджуваної речовини остання вводиться у дванадцятипалу кишку за 1 год до початку досліду в дозі  $ED_{50}$ , встановленої в скринінгових дослідженнях. Експериментальний холецистит у мурчаків після голодування протягом 24 год моделюють введенням у порожнину жовчного міхура 3% розчину перексиду водню [8]. З цією метою під внутрішньоочеревинним гексеналовим наркозом роблять розтин черевної порожнини, за допомогою тонкої ін'єкційної голки здійснюють частковий відбір жовчі з жовчного міхура і вводять 0,1 мл 3% розчину перексиду водню. Рану пошарово зашивають. Операцію проводять в асептичних умовах без застосування антибіотиків і сульфаніламідних препаратів. Після операції тваринам протягом 14 днів вводять досліджувану речовину в дозі, яка дорівнює  $ED_{50}$ , встановленої в ході скринінгу. Оцінку лікувального (холеспазмолітичного і протизапального) ефекту проводять з використанням морфологічних методів, визначаючи вплив досліджуваної речовини на локальний запальний процес. При цьому реєструють ступінь виразності набряку та інфільтрацію лімфоїдно-моноцитарними клітинами слизової оболонки жовчного міхура і нижче розташованих шарів сполучної тканини, наявність осередків дистрофії епітеліальних клітин.

#### 4. Дослідження холелітіазної дії біологічно активних речовин

##### Скринінг холелітіазної активності БАР

Для дослідження профілактичної дії препаратів при холелітіазі вивчається здатність БАР знижувати секрецію холестеролу або підвищувати вміст холатів у жовчі. Концентрацію холестеролу в жовчі визначають за методом, описаним у розд. 1, після введення досліджуваної речовини в 3–4 дозах. Додаткову інформацію про літогенні властивості жовчі дає ХХК, який визначається за загальним вмістом холатів у жовчі.

За результатами експериментів розраховують  $ED_{50}$  холелітіазної активності.

Можна використовувати здатність досліджуваної БАР розчиняти *in vitro* жовчні камені, які можуть бути отримані під час оперативного втручання у людей. До пробірки з розчинами досліджуваної речовини, взятої у різних концентраціях, поміщають жовчні камені або їхні частини і проводять спостереження протягом 24 год за умови перебування пробірок у термостаті при температурі 37°C. Обов'язковою є постановка контролю з водою або розчинником. Результат можна вважати задовільним, якщо в пробірці залишається дрібний завис діаметром до 1 мм або відбувається пом'якшення конкрементів.

При вивченні розчинності жовчних каменів необхідно враховувати їх склад та дотримуватись аналогічних умов у контрольних пробірках. Активність досліджуваної БАР порівнюють з такою у препаратів хенофальк, урсофальк, взятих в дозі  $ED_{50}$ .

##### Поглиблене вивчення БАР для лікування холелітіазу

Дослідження проводять на кролях або собаках. Тваринам під наркозом «підсаджують» у жовчний міхур жовчний камінь, який складає 15–20% об'єму жовчного міхура. Після зашивання рани можна вводити досліджувані препарати в  $ED_{50}$ , визначеній у ході скринінгових випробувань. Через деякий час, наприклад, 14 діб, оперативним шляхом вилучають (якщо він залишається) жовчний камінь з жовчного міхура лікованих тварин і досліджують його масу та щільність.

Для поглибленого вивчення холелітіазної активності БАР можна використовувати властивість речовин індукувати мікросомні ферменти печінки, стимулювати синтез і кон'югацію жовчних кислот, які поліпшують літогенні властивості жовчі. Наявність індукуючої дії встановлюють за зміною тривалості гексеналового сну у тварин після внутрішньоочеревинного введення 1% розчину гексеналу в дозі 80 мг/кг. Досліджувані БАР, а також препарат порівняння вводять у 3–4 дозах внутрішньошлунково, через 40 хв вводять гексенал. Вибір препаратів порівняння диктується як складом досліджуваної речовини, так і її структурою. При вивченні засобів рослинного походження, а також БАР, які мають фенольну структуру, раціонально як препарат порівняння використовувати легалон, карсил, силібор. У випадку, якщо до складу досліджуваної речовини або засобу входять фосфоліпідні компоненти, доцільно провести порівняльний аналіз їх ефективності з есенціалє, ліпіном.

Препарати порівняння застосовують в ефективних дозах  $ED_{30}$ ,  $ED_{50}$ , встановлених у попередніх дослідках.

#### 5. Вивчення гепатопротекторної дії біологічно активних речовин

Для моделювання гепатитів використовуються, як правило, гепатотоксичні ксенобіотики. Вимоги, запропоновані для модельних ушкоджень печінки, полягають у максимальному відтворенні патології, адекватної захворюванню печінки у людини, з урахуванням безпеки впливу токсичного агента для експериментаторів.

## 5.1. Моделювання ушкоджень печінки

### Скринінг БАР щодо гепатозахисної активності

Як скринінгову модель ушкодження печінки найчастіше використовують гостру жирову дистрофію печінки, яка виникає при введенні тетрахлорметану. Інтوکсикація тетрахлорметаном є класичною моделлю ушкодження субклітинних структур гепатоцитів. Токсична дія цього ксенобіотику пов'язана з утворенням, в результаті метаболізму в печінці, продуктів ВРО. Вони є індукторами ПОЛ, у результаті чого порушуються структура мембран клітин печінки та їх основної функції.

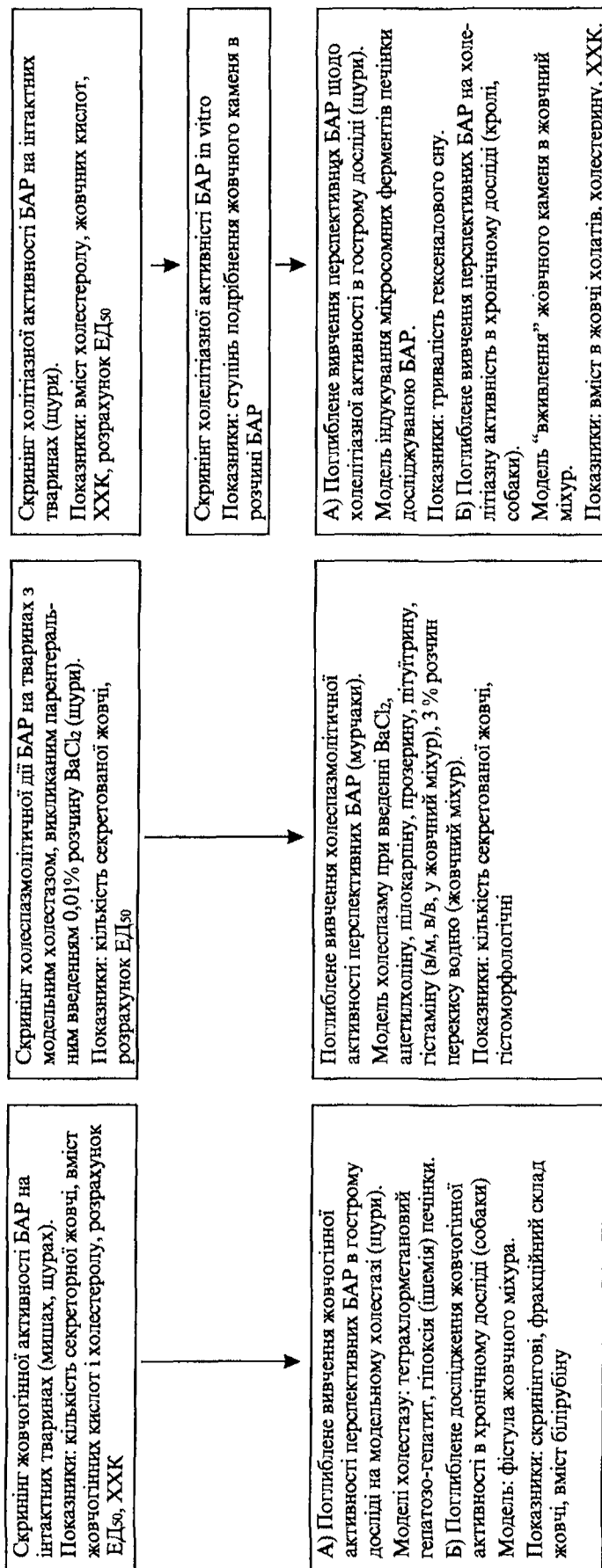
Найбільш значні зміни показників функціонального стану печінки (гіперферментемія амінотрансфераз та ЛФ, зменшення вмісту в печінці глікогену, порушення виділення БСФ, подовження тривалості гексеналового сну, порушення жовчовиділення) і морфологічні порушення (жирова інфільтрація і дегенерація, центролобулярний некроз) спостерігаються через 24–48 год після введення в організм гепатотоксину [9].

Для відтворення гострого токсичного ураження печінки тетрахлорметан вводять у вигляді 50% олійного розчину: мишам – 0,1 мл/10 г, щурам – 1 мл/100 г маси тіла внутрішньошлунково або 0,8 мл/100 г маси тіла підшкірно протягом 2 діб [10].

При використанні ентєрального способу введення

Таблиця 2

### Етапи доклінічного вивчення жовчогінної, холеспазмолітичної та холелітазної активності біологічно активних речовин БАР



гепатотоксину необхідно виключити з раціону жири, які прискорюють резорбцію тетрахлорметану із шлунку, сприяючи реалізації загальнотоксичної дії отрути.

При цьому досліджувані речовини і препарати порівняння вводять за 1 год до і через 2 год після введення отрути. Вивчення біохімічних та функціональних показників стану печінки проводять через 18–24 год після останнього введення тетрахлорметану.

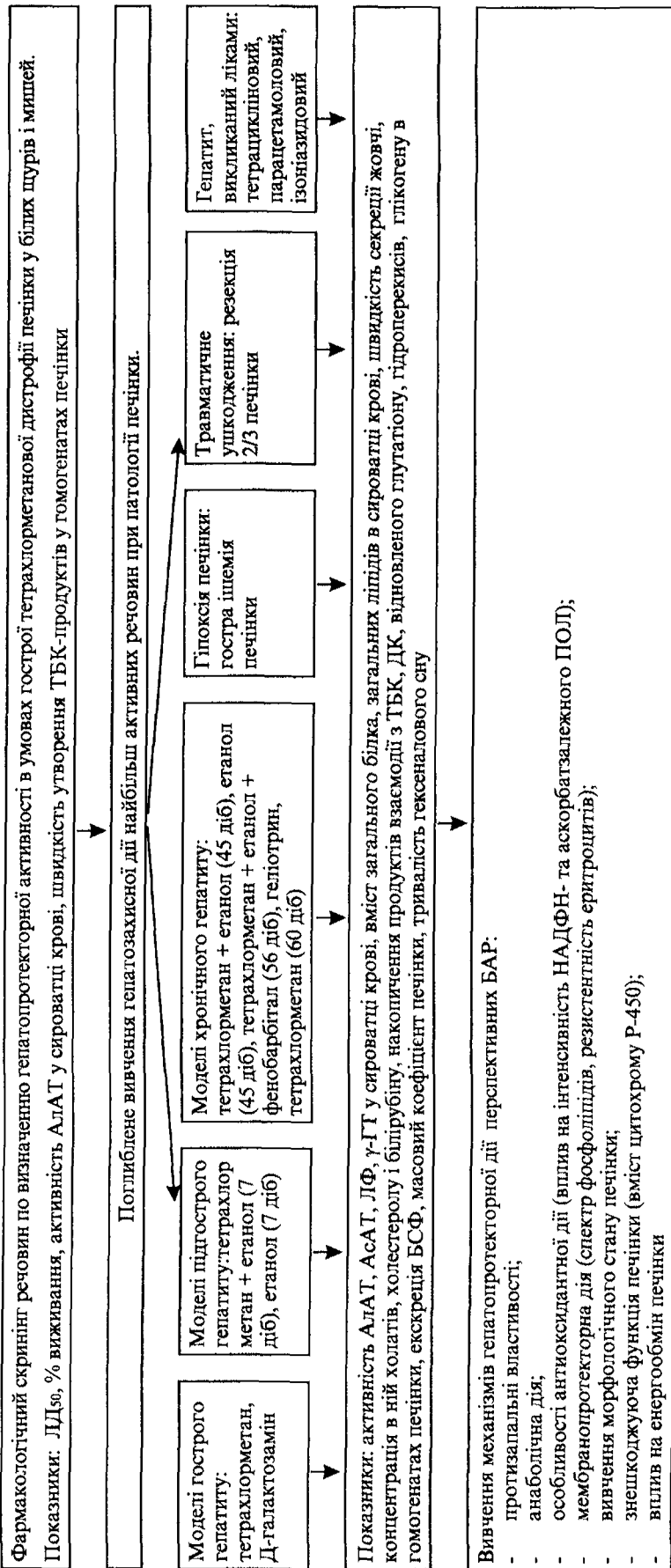
З метою відбору речовин для поглибленого фармакологічного вивчення в якості гепатопротекторних засобів у ході фармакологічного скринінгу необхідно враховувати інформативні показники, які дають можливість зробити висновок про наявність у речовин гепатозахисних властивостей.

При модельній патології печінки спостерігається загибель тварин, тому одним із критеріїв гепатопротекторного ефекту є відсоток виживання тварин. При цьому про перспективність гепатозахисної дії досліджуваних речовин можна судити в разі виживання 95–100% тварин.

Враховуючи, що модельне ушкодження печінки різними факторами супроводжується цитолітичним синдромом та інтенсифікацією процесів ПОЛ, у сироватці крові спостерігається збільшення активності маркерних ферментів цитолізу: АлАТ і АсАТ, ЛФ,  $\gamma$ -ГТ та ін. У тканині печінки зростає швидкість утворення та вміст продуктів ПОЛ: ДК, ГПЛ, ТБК-продуктів. Для первинної оцінки ступеню гепатопротекторного ефекту у фармакологічному

Таблиця 3

**Етапи доклінічного вивчення гепатопротекторної активності біологічно активних речовин**



скринінгу достатнім є визначення активності АлАТ у сироватці крові [11], швидкості утворення ТБК-продуктів, ДК або ГПЛ у гомогенатах печінки [12], які є стабільними інформативними показниками.

Крім того, однією із задач фармакологічного скринінгу речовин стосовно гепатозахисної активності є встановлення  $ED_{50}$  досліджуваних сполук. З цією метою вводять кілька доз, враховують відсоток виживання і виразність фармакологічного ефекту, а потім за графічним методом Я.І.Хаджая [2] визначають  $ED_{50}$  та її довірчі інтервали. Визначення  $ED_{50}$  проводять: для мембранопротекторної дії – за активністю АлАТ у сироватці крові; для антиоксидантної дії – за швидкістю індукованого утворення ТБК-продуктів у гомогенатах печінки.

Беручи до уваги той факт, що поняття «гепатозахисна активність» є збірним і включає кілька видів фармакологічної дії, при визначенні  $ED_{50}$  необхідно враховувати, що у скринінговому дослідженні проводиться аналіз фармакологічної ефективності досліджуваних речовин на фоні дії гепатотоксичної отрути.

Для обчислення  $ED_{50}$  як критерій гепатозахисного впливу необхідно враховувати показник виживання тварин. При цьому облік виживання тварин під дією досліджуваної речовини проводять в умовах експериментального ураження печінки гепатотоксичною отрутою, для якої попередньо визначено  $LD_{50}$ .

При проведенні поглибленого доклінічного дослідження БАР використовують в  $ED_{50}$  чи  $ED_{30}$ . Перспективними можна вважати речовини,  $ED_{50}$  яких не перевищує 15–25 мг/кг маси тіла.

### **Поглиблене вивчення гепатозахисної активності БАР**

Поглиблені дослідження гепатопротекторної дії найбільш перспективних БАР, виявлених у скринінгу, проводять з метою з'ясування їх ефективності за умов різних експериментальних моделей патології печінки та диференційованого визначення показань до їхнього клінічного застосування. При цьому для визначення терапевтичного ефекту використовують критерії, які характеризують функціональний та морфологічний стан печінки, а також біохімічні показники крові і печінки. Для виявлення профілактичного ефекту сполук їх вводять за 1 год до введення отрути, а лікувального – через 2 год після початку введення і далі за схемою залежно від моделі патології.

### **Моделювання гострих уражень**

Найчастіше використовується модель гострої жирової тетрахлорметанової дистрофії печінки (див. розд. 5.1). Для оцінки стану печінки використовують більш широкий спектр функціональних та біохімічних показників, ніж при скринінгових дослідженнях.

Однією з моделей гострого ушкодження печінки, за більшістю параметрів наближеною до гострого вірусного гепатиту у людей, є Д-галактозаміновий гепатит [13]. Д-галактозамін за хімічною природою є аміносахаром, похідним Д-галактози. Дія його на печінку пов'язана з обміном нуклеотидів, ушкодженням синтезу макромолекул, зростанням чутливості клітин печінки до ендотоксинів. Внаслідок цього відбувається лізис органел гепатоцитів і розвиток гепатиту. Запальна реакція в паренхімі печінки супроводжується жировою дегенерацією, ушкодженням мітохондрій, проліферацією ендоплазматичного ретикулула і фіброзом. Ключовим механізмом ушкодження гепатоцитів при цьому є активація ферментативного ПОЛ. В інших механізмах велике значення відіграє фосфорилування Д-галактозаміну в печінці з утворенням уридиндифосфатгалактозаміну. Внаслідок цього виникає дефіцит уридиндифосфату та його сполук з наступним ушкодженням структур печінки.

Д-галактозамін вводять щурам одноразово внутрішньоочеревинно в дозі 100 мг/100 г маси тіла. Дослідження функціонального стану, біохімічних і морфологічних показників печінки проводять через 24 год після введення отрути.

Методичним різновидом використання Д-галактозаміну солянокислого для моделювання печінкової недостатності є відтворення печінкової коми. З цією метою готують 20% розчин

Д-галактозаміну у 5 % розчині глюкози (рН 6,8) і вводять у вушну вену кроля зі швидкістю 10 мл/хв в дозі 600–900 мг/кг. Через 16,5–20,5 год у тварин виникають перші ознаки гострої печінкової енцефалопатії: погіршення здатності утримувати голову, зростання млявості, сонливості, м'язові посмикування, тремтіння голови та кінцівок, судоми, ністагмоїдні посмикування очних яблук, слиновиділення. Тривалість енцефалопатії – 1–5 год.

Досліджувані речовини і препарати порівняння вводять в ЕД<sub>50</sub> (ЕД<sub>30</sub>) з профілактичною метою за 1 год до, а з лікувальною – через 2 год після введення отрути.

### Моделювання підгострих уражень печінки

Досить часто для моделювання патології печінки, крім тетрахлорметану, використовується етанол або введення його спільно з тетрахлорметаном [14].

Токсичний вплив етанолу на печінку пов'язаний з тим, що його метаболізм на 80% здійснюється саме в цьому органі. Головний метаболіт етанолу – ацетальдегід – за гепатотоксичністю переважає дію етанолу.

При надходженні етанолу в клітини печінки спостерігаються зміни активності мікосомних ферментів, вмісту цитохрому Р-450, переважно етанолзалежної ізоформи Р-450 2Е1, причому спрямованість і вираженість цих змін залежать від дози і тривалості прийому етанолу, який здатний «завантажити» печінку на 3/4 від усієї її окисної потужності. Цього достатньо, аби зменшити будь-які інші окислювальні процеси, що відбуваються за участю нікотинамідадениндинуклеотиду (НАД) (метаболізм тригліцеридів, жирних кислот, гормонів і т.ін.).

Ушкодження мембран гепатоцитів при цьому відбувається як внаслідок прямої дії етанолу, так і в результаті активації ліпопероксидації під впливом його метаболітів. Етанол викликає у сироватці крові гіперферментемію  $\gamma$ -ГТ, активність якої є одним з найважливіших критеріїв інтоксикації етанолом. Існує кореляція між кількістю етанолу, який надійшов до організму та активністю  $\gamma$ -ГТ, що є наслідком індукції ферменту на мембранах мікосом печінки.

Модель «алкогольного гепатиту» можна одержати шляхом повторного введення 40% розчину етанолу в дозі 7 мл/кг маси внутрішньошлунково протягом 7 днів [15].

Досліджувані речовини та препарати порівняння вводять щодоби через 1 год після надходження отрути. Через 72 год після останнього введення гепатотоксину досліджують біохімічні і функціональні показники стану печінки.

Більш суттєві порушення функції печінки вдається одержати при комбінованому введенні тетрахлорметану та етанолу [16]. Механізм ушкодження паренхіми печінки при цьому аналогічний, однак ступінь і глибина ураження клітин ускладнюється внаслідок синергізму цих речовин. Гепатотоксини вводять за наступною схемою: 50% олійний розчин тетрахлорметану підшкірно в дозі 0,4 мл/100 г маси; через 3 год – внутрішньошлунково 40% етанол в дозі 1,3 мл/100 г маси. Аналогічну процедуру повторюють протягом 4 діб. Досліджувані речовини і препарати порівняння вводять за 1 год до введення гепатотоксичних отрут протягом усього періоду отруєння тварин та через 72 год після неї. Аналіз функціональних і біохімічних показників проводять через 72 год після останнього введення гепатотоксичних сполук.

### Моделювання уражень печінки ліками

До гепатотоксичних ксенобіотиків, що використовуються для моделювання медикаментозних гепатитів, належать парацетамол і тетрациклін.

При передозуванні парацетамолу виникає важке ушкодження паренхіми печінки, обумовлене утворенням високотоксичного метаболіту N-ацетил-p-бензохіноніміну, здатного утворювати незворотні ковалентні зв'язки з життєво важливими макромолекулами гепатоцитів, викликаючи некроз печінки в центральних і середніх відділах печінкових часточок вже через 24 год після введення щуром парацетамолу в токсичних дозах.

Модель токсичного медикаментозного некрозу печінки одержують введенням парацетамолу щуром у дозі 1250 мг/кг у шлунок 1 раз на добу у вигляді суспензії в 2% розчині крохмаль-



ного гелю протягом 2 діб [17]. Досліджувані речовини та препарати порівняння вводять тваринам щодня за 1 год до і через 2 год після застосування отрути. Оцінку стану печінки проводять через 18–20 год після останнього введення парацетамолу.

Антибіотик тетрациклін належить до засобів прямої ушкоджуючої дії щодо печінки, інгібуючи сукцинатдегідрогеназу, цитохромоксидазу, ЛФ, аргіназу активність [18, 19]. Тетрациклін знижує інтенсивність аеробного дихання і сполученого з ним окислювального фосфорилування, порушує обмін білків, жирів, вуглеводів, білірубину [20]. При цьому однією з ключових ланок у механізмі ураження печінки тетрацикліном є активація процесів ВРО.

Тетрациклін вводять внутрішньоплунково щурам у вигляді зависі на 1% крохмальному клейстері у дозі 500 мг/кг маси тіла щодня протягом 5 діб [21]. Досліджувані речовини і препарати порівняння вводять тваринам протягом усього періоду застосування отрути і в наступні 2 доби за 1 год до надходження тетрацикліну. Через 3 доби після останнього введення тетрацикліну досліджують стан печінки.

Однією з моделей субхронічного ушкодження печінки медикаментозними засобами є модель комбінованої дії ізоніазиду, рифампіцину та піразинаміду, які вводять у шлунок в дозах 50, 500 та 1500 мг/кг маси тіла відповідно протягом 14 діб. Через 24 год після останнього введення туберкулостатиків проводять аналіз функціонального стану печінки, біохімічні та морфологічні дослідження.

У результаті токсичної дії вказаних туберкулостатиків спостерігається гепатоцитоліз, холестаза, індукція процесів ВРО та ПОЛ. Крім того, порушуються окисно-відновні процеси у печінці, особливо на максимумі активності реакцій ПОЛ. Разом з цим, значно знижується жовчоутворення, пригнічується швидкість секреції жовчі, зменшується виділення жовчних кислот, білірубину та холестеролу.

Для відтворення гепатиту можна використовувати ізоніазид, який самостійно вводять щурам внутрішньоочеревинно в дозі 100 мг/кг маси тіла щодня протягом 14 діб [22]. Досліджувані речовини і препарати порівняння вводять з 8-го по 14-й день досліду.

### **Моделювання травматичного ушкодження печінки**

З метою вивчення впливу досліджуваних речовин на регенераторну здатність гепатоцитів, а також на функціональний стан печінки після її травматичного ушкодження використовують модель резекції 2/3 частини печінки щурів [23].

Тваринам під барбаміловим наркозом (80 мг/кг маси тіла внутрішньоочеревинно у вигляді 1% розчину) в асептичних умовах каудально від мечоподібного відростка проводять медіальну лапаротомію – розріз довжиною 3–4 см. Ліву і середину частки печінки видаляють з черевної порожнини, на судинний стовбур накладають кетутову лігатуру і частки печінки відтинають. Очеревину і шкіру зшивають стерильною шовковою ниткою. Ектомії підлягає 68% маси печінки тварини, що викликає виражене порушення її функціональних властивостей [23]. Максимальні патологічні зміни в печінці спостерігаються на 5 добу досліджень. Препарати порівняння і речовини, які досліджують, вводять щодня протягом 5 діб. На 6-ту добу проводять аналіз біохімічних, функціональних і морфологічних показників стану печінки.

### **Моделювання гіпоксичного стану печінки**

Відомо, що одним з патогенетичних факторів при більшості захворювань печінки, що супроводжуються порушенням гемодинаміки, а також при оперативних втручаннях, коли проводиться тимчасове виключення кровотоку, є гіпоксія. Вона досить сильно впливає на перебіг і результат багатьох внутрішніх хвороб. Печінка, після мозку, є одним із найбільш чутливих до кисневого голодування органів.

Припинення кровообігу в органах супроводжується накопиченням продуктів ПОЛ та зниженням активності ферментативних та неферментативних антиоксидантних систем, що, у

свою чергу, призводить до порушення проникності мембран гепатоцитів. При цьому збільшується гепатоцитоліз, активується гліколіз, зменшуються процеси жовчоутворення [24].

Активациі процесів ВРО належить, без сумніву, провідна роль в ушкодженні цитохрому Р-450.

Гостру субтотальну ішемію печінки у білих щурів викликають шляхом накладання за умов барбамілового наркозу лігатури на судинну ніжку лівої і середньої долі печінки на 15, 30, 60, 120 хв. Досвід вказує, що більш доцільним є час припинення кровообігу на 30–60 хв [25]. Повну (тотальну) ішемію печінки викликають шляхом оклюзії печінкової артерії, порталльної і печінкової вен та ізоляції печінки від клітковини – останнє потребує накладання портокавального шунта).

Досліджувані речовини і препарати порівняння вводять тваринам в  $ED_{30}$  і  $ED_{50}$  за 1 год до проведення операції.

Дослідження біохімічних показників проводять безпосередньо після закінчення ішемії печінки.

### Моделювання хронічних уражень печінки

Для моделювання хронічного гепатиту і, тим більше, цирозу печінки, необхідне тривале введення в організм тварин гепатотоксичної отрути. Так, для отримання хронічного гепатиту 50% олійний розчин тетрахлорметану необхідно вводити щурам по 0,2–0,4 мл/100 г 2–3 рази на тиждень протягом 60 діб. При відтворенні хронічного гепатиту у кролів вводять 50% олійний розчин тетрахлорметану (підшкірно, тричі на тиждень, з розрахунку 0,3 мл/кг) протягом 45 діб [26].

Цироз печінки викликають, як правило, введенням тетрахлорметану у вищезазначених дозах протягом 5 місяців. Причому, тварини повинні вживати їжу, бідну на білок: зерно, хліб, вершкова олія, пряжене свиняче сало. У собак, яким щодня вводиться 10 мл тетрахлорметану і згодовується їжа, яка містить 80% жиру, ознаки цирозу спостерігаються вже через кілька тижнів [27]. Переважно м'ясне харчування у стадії цирозу призводить до утворення асцити.

У моделюванні хронічного гепатиту і цирозу для уникнення регенерації важливо, щоб між прийомом отрути не було тривалих перерв, при цьому досліджувані речовини і препарати порівняння вводять тваринам в  $ED_{30}$  чи  $ED_{50}$  протягом усього періоду введення отрути.

Оскільки в патогенезі хронічного гепатиту і цирозу печінки велику роль відіграють автоімунні порушення, для доказу адекватності моделі необхідно проводити імунологічні дослідження. Зокрема, хронічному активному гепатиту найбільш властиве підвищення концентрації IgG і, меншою мірою, IgM. При первинному біліарному цирозі, як правило, підвищується концентрація IgM на фоні помірного підвищення вмісту імуноглобулінів інших класів. При алкогольному цирозі найвищого рівня досягає IgA. Важливою ознакою порушеного стану імунітету при хронічних активних захворюваннях печінки є поява у крові аутоантитіл, що реагують з різними антигенними компонентами клітин і тканин.

Імунологічними маркерами хронічних захворювань печінки є антитіла до гладенької мускулатури, мітохондрій, мікросом печінки та нирок. Доречним є визначення Т- і В-лімфоцитів методом розеткоутворення, проведення реакцій гальмування міграції лейкоцитів, БТЛ на ФГА. Остання належить до числа універсальних тестів, що дозволяють оцінити функціональну активність Т-лімфоцитів. При хронічному гепатиті і цирозі здатність лімфоцитів до трансформації в бласти під впливом ФГА знижується.

Хронічний гепатит з явищами раннього фіброзу відтворюється також поєднаним введенням тетрахлорметану та етанолу. Отруєння щурів проводять щодня протягом 45 діб. Етанол вводять внутрішньошлунково з розрахунку 35 мг/кг маси тіла тварин. Через 20–30 хв після введення спирту, також інтрагастрально, вводять тетрахлорметан у дозі 0,2 мл/100 г маси у вигляді 20% олійного розчину [28]. Досліджувані сполуки і препарати порівняння вводять у  $ED_{30}$  або  $ED_{50}$  щодня протягом терміну моделювання патології.

Відтворення хронічної патології печінки можна здійснити шляхом комбінованої дії на печінку тетрахлорметану, етанолу і фенобарбіталу. З цією метою отрути вводять за схемою: про-

тягом 7 діб щурам щодня перорально вводять тетрахлорметан у вигляді 20% олійного розчину по 0,2 мл/100 г маси тіла. Починаючи з 8-ї доби і до закінчення терміну моделювання патології (протягом 30 діб), паралельно з тетрахлорметаном вводять 40% етиловий спирт по 0,7 мл/100 г маси тварини внутрішньошлунково. Фенobarbital вводять чотирма курсами (по 3 доби кожен) у дозі 80 мг/кг внутрішньошлунково, починаючи з 10-ої доби отруєння тварин з 5-добовим інтервалом між введеннями [29].

Досліджувані сполуки і препарати порівняння вводять в ЕД<sub>30</sub> чи ЕД<sub>50</sub>, починаючи з наступної доби після останнього введення отрути, протягом 20 діб.

Одним з високопродуктивних методичних прийомів моделювання хронічного гепатиту є використання алкалоїду геліотрину [30], який вводять щурам підшкірно у дозах, що зменшуються, через добу протягом 25 діб у вигляді нейтрального розчину: 7 діб по 10 мг, з 8-ї – по 7,5 мг і з 14-ї – по 5 мг/100 г маси тіла тварини. Паралельно група контрольних тварин одержує підшкірно аналогічні об'єми фізіологічного розчину.

Препарати порівняння вводять протягом усього періоду отруєння в ЕД<sub>30</sub> чи ЕД<sub>50</sub>.

## **5.2. Вивчення особливостей фармакодинаміки перспективних біологічно активних речовин та можливих механізмів їх гепатозахисної дії**

### **Вивчення антиоксидантної дії БАР**

Враховуючи, що при більшості захворювань печінки провідною ланкою патогенезу є інтенсифікація ВРО і ПОЛ, вивчення ефективності перспективних БАР необхідно проводити шляхом поглибленого дослідження змін показників, що характеризують ці процеси. До них належать: вміст ГПЛ [32], ДК [31], супероксиданіону [33], відновленого глутатіону [34], активність каталази [35], глутатіонпероксидази [36] і супероксиддисмутази [37] у сироватці крові та гомогенатах печінки і субклітинних фракціях гепатоцитів. Крім того, необхідно визначати швидкість Fe<sup>2+</sup> аскорбатзалежного (неферментативного) і НАДФН-залежного (ферментативного) накопичення продуктів реакції ТБК [38].

### **Вивчення детоксикуючої функції печінки**

Однією з основних функцій печінки є її здатність знешкоджувати токсичні продукти в організмі. Тому стан детоксикуючої функції печінки є одним із показників гепатозахисної дії речовин.

Для оцінки детоксикуючої дії печінки білим щурам внутрішньоочеревинно вводять 1–2% розчин гексеналу з розрахунку 40–80 мг/кг маси тіла. У інтактних тварин при введенні гексеналу в дозі 80 мг/кг тривалість бічного положення становить 45–60 хв. Збільшення тривалості гексеналового сну свідчить про зниження детоксикуючої функції печінки, його скорочення (внаслідок активації мікросомних оксигеназ, метаболізуючих гексенал) – про посилення цієї функції.

### **Вивчення жовчоутворюючої функції печінки**

При патологічних процесах у печінці однією з перших порушується її жовчоутворююча функція. Тому позитивна динаміка відновлення показників, що характеризують жовчогенез, може служити підтвердженням наявності у речовин, які досліджують, гепатопротекторного ефекту. Оцінка жовчоутворюючої функції печінки проводиться за методиками, описаними у розділі 2.

### **Оцінка поглинально-видільної функції печінки**

Відомо, що гепатоцити здатні знешкоджувати різні речовини шляхом кон'югації їх з метаболітами організму. Сполуки, що утворюються при цьому, легко виводяться з організму з жовцю або із сечею.

В основі методу оцінки поглинально-видільної функції печінки лежить здатність гепатоцитів захоплювати БСФ і, зв'язавши його з глутатіоном, виділяти в жовч. При цьому жовч набуває лілового забарвлення.

Для проведення БСФ проби після закінчення збирання жовчі, щурам у хвостову чи стегонову вену вводять 0,6% розчин БСФ із розрахунку 5 мг/кг. Визначають терміни виникнення та зникнення барвника в крові та жовчі (термін виділення останньої забарвленої краплі жовчі з канюлі). За терміном надходження барвника до жовчі можна зробити висновок про стан поглинальної функції гепатоцитів.

Зникнення барвника свідчить про поглинання його купферівськими клітинами і характеризує функціональний стан ендотеліоцитів. Термін зникнення БСФ з жовчі вказує на активність процесів глюкуронізації в ендоплазматичному ретикулумі печінки. Проба БСФ – один з найчутливіших тестів в оцінці функціонального стану печінки.

### **Визначення білковоутворюючої функції печінки**

Показниками білковоутворюючої функції печінки є вміст загального білка у сироватці крові і результати протеїнограми. При визначенні вмісту загального білка використовують біуретовий реактив [39] або метод Лоурі [40]. Кількісне визначення проводять за графіком, побудованим з використанням альбуміну сироватки крові.

Електрофоретичне розділення білкових фракцій має більшу діагностичну цінність, ніж визначення загальної кількості білка в сироватці крові, оскільки патологічні процеси в печінці супроводжуються, як правило, зменшенням вмісту альбумінів і збільшенням g-глобулінів. Електрофорез білків сироватки здійснюють на хроматографічному папері з використанням гелевих середовищ [41].

### **Визначення активності індикаторних і екскреторних ферментів сироватки крові**

Щурів в умовах евтаназії декапітують, в сироватці крові визначають активність сорбітолдегідрогенази [42], АлАт, АсАт [11], ЛФ [43], ЛДГ [41],  $\gamma$ -ГТ [41], ХЕ [41]. Співвідношення показників активності АсАт і АлАт – коефіцієнт де Рітіса [2] – свідчить про гостроту ураження печінки; зменшення його є характерним для більш гострого перебігу патологічного процесу.

Зростання активності ЛФ сироватки крові є показником холестазу, різке підвищення її активності супроводжується атрофічними змінами в печінці.

Підвищення активності ЛДГ пов'язане також з некрозом тканин, і особливу інформативність має підвищення активності ЛДГ5. Підвищення активності  $\gamma$ -ГТ – високочутливий печінковий тест, що свідчить про ушкодження гепатоцитів, виникнення холестазу, і є більш чутливим тестом порівняно з визначенням активності ЛФ [43]. Особливої цінності він набуває при алкогольному ушкодженні печінки, проявляючи прямо пропорційну залежність активності ферменту від ступеню ураження печінки. У зв'язку з тим, що синтез ХЕ відбувається в клітинах печінки, гіпохолінестераземія, як правило, вказує на захворювання печінки. Ступінь зниження активності ферменту у сироватці крові свідчать про тяжкість і поширення ураження гепатоцитів.

### **Визначення масового коефіцієнту печінки**

У щурів після декапітації видаляють та зважують печінку і визначають співвідношення між її масою та масою тварини. Збільшення масового коефіцієнту печінки свідчить про гемодинамічні порушення в цьому органі, наслідком чого може бути набряк.

При цьому досліджувані речовини не повинні впливати на масу тіла тварин.

### **Вивчення глікогенутворюючої функції печінки**

У гомогенаті печінки визначають глікоген, у крові – вміст глюкози. Підвищення рівня глікогену в печінці свідчить про поліпшення її функціонального стану. Визначення рівня глюкози в крові необхідне для виявлення гіпоглікемічної активності досліджуваних речовин.

**Морфологічне вивчення печінки**

Тканину печінки фіксують, після спеціальної обробки проводять світло- та електронномікроскопічне вивчення її структури, що дозволяє оцінити ступінь жирової і білкової дистрофії. Стан гістоструктур печінки досліджують, якщо можна, із застосуванням кількісної оцінки (цитометрія).

**Математичний аналіз отриманих експериментальних даних**

Статистичну обробку експериментальних даних проводять будь-яким з відомих методів, які дозволяють обчислити середнє арифметичне значення досліджуваного показника ( $M$ ) і його помилку ( $m$ ).

Достовірність оцінки гепатозахисної дії досліджуваних БАР значною мірою підвищує рівень статистичного аналізу кореляцій між змінами біохімічних показників стану печінки і даними гістологічного контролю.

З цією метою будь-яким з математичних методів розраховують значення коефіцієнта кореляції ( $r$ ) показників цитолізу і холестази (активність АЛАТ, АсАТ, альдолази, ЛФ і вмісту холестеролу у сироватці крові) з даними морфометричного аналізу уражень печінки, до яких, за В.В.Серовим та К.Лапишем [44] належать жирова дистрофія і осередки коліквацийного некрозу; антиген НBSAg; алкогольний гіалін (тільца Меллорі).

**Література**

1. Скакун Н.П. Основы фармакологии желчевыделительного процесса: Автореф. дисс... д-ра мед. наук.– Львов, 1960.– 24 с.
2. Хаджай Я.И. О графическом способе определения эффективной дозы и ее доверительных границ при учете реакций в градуированной форме//Фармакол. и токсикол.– 1965.– №1 – С. 118–122.
3. Мироненко В.П., Громашевская Л.Л., Касаткина М.Г., Коцечек Г.А. Определение содержания желчных кислот и холестерина в желчи//Лабор. дело.– 1978.– №3.– С. 149–153.
4. Дрогозов С.М. Сравнительное изучение и особенности действия желчегонных препаратов на желчеобразовательную функцию печени в норме и патологии: Дисс... д-ра мед. наук.– 1971.– 386 с.
5. Сидоров К.К. О классификации ядов при парентеральных способах введения//Токсикология новых промышленных веществ.– М., 1973.– Вып.13.– С. 47–51.
6. Дудник М.В., Биленко А.В., Алесенко А.В. и др. Интенсификация перекисного окисления и изменения состава липидов в гомогенате и субклеточных фракций ишемизированой печени//Бюлл. эксперим. биол. и мед.– 1980.– Т.89, №5.– С. 566–558.
7. Скакун Н.П. Основы фармакологии желчевыделительного процесса: Автореф. дисс... д-ра мед. наук.– Львов-Тернополь, 1960.
8. Николаев С.М. Экспериментальная фармакотерапия фитопрепаратами повреждения органов гепатобилиарной системы: Дисс... д-ра мед. наук.– Улан-Уде, 1986.– С. 28–42.
9. Губский Ю.И. АТФ-азная активность митохондрий печени крыс при остром отравлении тетрахлорметаном//Укр. биохим. журн.– 1982.– Т.54, №1.– С. 46–50.
10. Поздняков В.С., Иванов Н.Г. Изменение функционального состояния у крыс при воздействии четыреххлористого углерода//Токсикология новых промышленных хим. веществ.– М.: Медицина, 1979.– вып.15.– С. 87–90.
11. Reitmann S., Frankel S.A. Calcimetric method for the determination of berum and glutamanie puguvis transaminases//Am. Clin. Pathol.– 1957.– V.28, №1.– P. 56–59.
12. Стальная И.Д., Гаришвили Т.Г. Метод определения малонового диальдегида с помощью тиобарбитуровой кислоты//Современные методы в биохимии/Под ред. В.Н.Ореховича.– М., 1977.– С. 44–46.

13. Матюшин Б.Н., Логинов А.С., Аушева Л.Х. и др. Активность микросомальных ферментов и перекисное окисление липидов печени при ее поражении галактозамином//Бюлл. эксперим. биол. и мед.– 1983.– №2.– С. 53–55.
14. Мансуров Х.Х., Мироджов Г.Н. Алкоголь и печень – метаболические и токсические эффекты//Терапевт. арх.– 1983.– Т.55.– №2.– С. 51–56.
15. Олейник А.Н. Поражение печени ксенобиотиками в сочетании с этанолом и их фармакотерапия физиологически активными веществами.– М.: Медицина, 1982.– С. 213–214.
16. Скакун Н.П., Ковальчук С.Ф. Эффективность антиоксидантов при комбинированном поражении печени четыреххлористым углеродом и этанолом//Фармакол. и токсикол.– 1987.– Т.50, №3.– С. 97–100.
17. Скакун Н.П., Шманько В.В. Состояние перекисного окисления липидов и желчеобразования при поражении печени парацетамолом//Фармакол. и токсикол.– 1984.– №4.– С. 105–109.
18. Скакун Н.П., Высоцкий И.Ю. Влияние тетрациклиновых антибиотиков на перекисное окисление липидов//Антибиотики.– 1982.– №9.– С. 44–46.
19. Гуляева А.Е., Кишван Т.Я., Надирова Б.А. Возрастной аспект во взаимодействии тетрациклинов с субклеточными фракциями гомогената печени крыс//Антибиотики.– 1982.– №10.– С. 56–58.
20. Блюгер А.Ф., Новицкий И.Н. Практическая гепатология.– Рига: Звейгзне, 1984.– С. 58–59.
21. Баган Н.Ю. Функционально-биохимическая характеристика и экспериментальная фармакотерапия тетрациклиновых поражений печени: Автореф. дис. ... канд. мед. наук.– К., 1991.– 28 с.
22. Шманько В.В. Функционально-биохимическая характеристика поражения печени парацетамолом и изониазидом и их экспериментальная фармакотерапия: Автореф. дисс. ... канд. мед. наук.– К., 1986.– 25 с.
23. Фишер А. Физиология и экспериментальная патология печени.– Будапешт: Изд-во АН Венгрии, 1961.– 215 с.
24. Дудник Л.Б., Биленко М.В., Алесенко А.В. и др. Интенсификация перекисного окисления и изучение состава липидов в гомогенате и субклеточных фракциях ишемизированной печени //Бюллетень экспериментальной биологии и медицины.– 1980.–Т.89.– №5.– С. 556–558.
25. Слышков В.В. Поиск и фармакологическое изучение веществ с желчегонным и гепатозащитным действием среди производных оксикоричных кислот и 1Н-1,2-диазофенолена: Автореф. дисс. ... канд. мед. наук.– К., 1990.– 32 с.
26. Воспроизведение заболеваний у животных для экспериментально-терапевтических исследований/Под ред. Н.В.Лазарева.– Л.: Медгиз, 1954.– С. 165–170.
27. Фишер А. Физиология и экспериментальная патология печени.– Будапешт: Изд-во АН Венгрии, 1961.– С. 192–195.
28. Мансурова И.Д., Гиаев Х.Т., Ткаличева Л.И. и др. Экспериментальная модель раннего фиброобразования паренхимы печени по типу цирроза и ее функциональная характеристика//Экспериментальная патология печени. Алкоголь и печень.– Душанбе, 1976.– С. 189–212.
29. Мансуров Х.Х., Мироджов Г.К. Этанол и печень//Пробл. гастроэнтерол.– Душанбе, 1985.– Вып.6.– С. 57–74.
30. Абдуллаев Н.Х., Зуфаров К.А., Каримов Х.Я. Взаимоотношения структуры, микроциркуляции и сосудисто-тканевой проницаемости печени при экспериментальном и токсическом ее поражении//Бюлл. эксперим. биол. и мед.– 1976.– Т.82, №11.– С. 1300–1302.
31. Стальная И.Д. Метод определения диеновой конъюгации ненасыщенных высших жирных кислот//Современные методы в биохимии/Под ред. В.Н.Ореховича.– М.: Медицина, 1977.– С. 43–44.

32. Гаврилов В.Б., Мишкорудная М.И. Спектрофотометрическое определение содержания гидроперекисей липидов в плазме крови//Лабор. дело.– 1983.– №3.– С. 33–35.
33. Omura T., Sato R., The carbon monoxide binding pigments of liver microsomes. Solubilisation, purification and properties//J. Biol. Chem.– 1964.– V.239, №7.– P. 2379–2385
34. Сондоре В.Ю., Крупникова Э.З., Филлер Я.М. и др. Восстановленный глутатион в крови при остром и хроническом вирусном гепатите и некоторых других поражениях печени//Биохимическая характеристика патологических процессов.– Рига, 1980.– С. 50–53.
35. Королюк М.А., Иванова Л.И., Майорова И.Т., Токарев В.Е. Метод определения активности каталазы//Лабор. дело.– 1988.– №1.– С. 16–18.
36. Prohaska J.R., Ganther H.E. Glutathione peroxidase activity of glutathione-S-transferases purified from rat liver//Biochem. Biophys. Res. Commun.– 1977.– V.76.– P. 437–445.
37. Чевари С., Чаба И., Секей И. Роль супероксиддисмутазы в окислительных процессах клетки и метод определения ее в биохимических материалах//Лабор. дело.– 1985.– №11.– С. 678–681.
38. Владимиров Ю.А., Арчаков А.И. Перекисное окисление липидов в биомембранах.– М.: Наука, 1972.– 252 с.
39. Справочник биохимика/Досон Р., Эллиот Д., Эллиот У., Джонс К.: Пер. с англ.– М.: Мир, 1991.– 543 с.
40. Lowry O.H., Rosenbrough N.J., Farr A.L., Randall R.J. Protein measurement with the Folin phenol reagent//J. Biol. Chem.– 1951.– V.193.– P. 265–275.
41. Колб В.Г., Камышников В.С. Справочник по клинической биохимии.– Минск: Беларусь.– 266 с.
42. Asada M., Galambos R.J. Sorbitol dehydrogenase hepatocellular injury: an experimental and clinical study//Gastroenterol.– 1963.– V.44.– P. 578–587.
43. Определение активности щелочной фосфатазы в сыворотке крови по гидролизу п-нитрофенилфосфата (метод Бессея, Лоури, Брока)//Справочник по клинической химии. В.Г.Колб, В.С. Камышников.– Минск.– Беларусь.–1982.–118–121.
44. Серов В.В., Лапиш К. Морфологическая диагностика заболеваний печени.– М.: Медицина, 1989.– 320 с.

## **ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНЕ (ДОКЛІНІЧНЕ) ВИВЧЕННЯ ФАРМАКОЛОГІЧНИХ РЕЧОВИН, ЩО ПРОПОНУЮТЬСЯ ЯК ТРАНКВІЛІЗАТОРИ ТА НЕЙРОЛЕПТИКИ**

Комісаров І.В.,  
Тіхонов В.Н.

### **Перелік скорочень**

**ГАМК** – гамма-аміномасляна кислота  
**ДФЦ** – Державний фармакологічний центр  
**ЛЗ** – лікарський засіб  
**МЕД** – мінімально ефективна доза  
**ФЗ** – фармакологічний засіб  
**УРАУ** – умовний рефлекс активного уникнення  
**ЦНС** – центральна нервова система  
**ЕЕГ** – електроенцефалограма

### **1. Обґрунтування оптимальних підходів до пошуку і вивчення транквілізаторів та нейролептиків**

Спрямований пошук психофармакологічних засобів значною мірою утруднюється неможливістю моделювання психопатологічних порушень у тварин в експерименті. Тому пошук психотропних засобів йде шляхом виявлення у нових хімічних речовин тих видів фармакологічної активності, які властиві клінічно випробуваним транквілізаторам, нейролентикам, антидепресантам, ноотропам і т.п.

Можливість прогнозу клінічної ефективності анксиолітиків (транквілізаторів) базується на їх здатності у фармакологічному експерименті зменшувати вже в малих дозах спонтанну рухову активність тварин, істотно посилювати ефекти наркозних засобів, снодійних і аналгетиків, робити неможливою і усувати судомну дію коразолу та інших конвульсантів, пригнічувати елементарні форми невротичних розладів, що виникають у тварин за умов «конфліктної ситуації» та за інших умов експериментального стресу.

Прогноз нейролентичної активності у фармакологічному експерименті базується, по суті, на тих самих тестах, що й транквілізуючої, але суттєвим доповненням до них є експерименти, за допомогою яких вдається виявити антагонізм речовин з фенаміном, апоморфіном, іншими ад-рено- і дофаміноміметиками. Має значення також здатність нейролептиків викликати ката-ленсію, усувати агресивну поведінку і пригнічувати усталені умовні рефлексивні уникнення в дозах значно менших, ніж дози транквілізаторів.

Однак, існування атипичних нейролептиків, наприклад сульпіриду, позбавленого каталентогенних властивостей, а також небензодіазепінових анксиолітиків, наприклад буспірону, якому властива антиапоморфінова активність, робить перелічені вище відмінності вельми умовними. Саме тому пошук і вивчення транквілізаторів і нейролептиків повинні засновуватися



на єдиній методичній схемі принаймні на етапах скринінгу (1-й етап) і початкових доклінічних досліджень (2-й етап). Повне доклінічне дослідження специфічної фармакологічної активності потенційних транквілізаторів або нейролептиків може базуватися лише на комплексі скринінг-тестів, нейрофізіологічних, нейробіохімічних і поведінкових методик.

## 2. Загальні положення і конструкція досліджень

Звіт про експериментальне вивчення фармакологічного засобу (ФЗ), що подається до ДФЦ МЗ України, складається із звіту про експериментальне дослідження безпечності фармакологічного засобу (ФЗ) і звіту про вивчення специфічної і загальної фармакологічної активності [1]. Обсяг дослідження безпечності наведений у згаданих рекомендаціях досить повно, але вимоги до вивчення специфічної активності транквілізаторів і нейролептиків – лише в загальній формі [1; с.19].

Не залежно від передбачуваного обсягу досліджень нових потенційних транквілізаторів або нейролептиків, їх вивчення повинно проводитись у порівнянні з найвідомішими транквілізаторами (діазепам) або нейролептиками (трифтазин, галоперидол) на кількох видах тварин (2–3). Спосіб введення залежить від розчинності сполуки, але має бути використаний і той, який рекомендується для клінічного застосування.

Загальна композиція дослідження специфічної активності складається з 3-ох елементів: скринінгові дослідження, поглиблені доклінічні і уточнюючі доклінічні дослідження. Задачею скринінгових досліджень є визначення депримуючого впливу сполуки на ЦНС і отримання на основі скринінг-тестів даних про характер цієї дії: чи є вона загальнопригнічуючою або вибірковою. Другий етап, заснований на використанні більш специфічних тестів і методів, повинен виявити у речовини, що вивчається, типові для транквілізаторів або нейролептиків властивості. Уточнюючі доклінічні дослідження зазвичай спрямовані на з'ясування механізмів дії ФЗ і можуть слугувати додатковим обґрунтуванням раніше зробленого висновку про спектр його психофармакологічної активності.

Оцінка різних видів активності сполуки повинна, при можливості, проводитися в альтернативній формі і характеризуватися загальноприйнятими параметрами ( $ED_{50}$ ). Результати експериментів необхідно подавати в статистично обробленій формі, бажано у вигляді таблиць, графіків, рисунків.

## 3. Скринінгові дослідження (1-й етап)

Ці дослідження включають оцінку впливу сполуки на спонтанні форми поведінки (наприклад, спонтанну рухову активність), прості поведінкові рефлексі, координацію рухів і м'язовий тонус, температуру тіла і взаємодію з судомними отрутами, снодійними і наркозними засобами.

3.1. Вплив на спонтанну рухову активність (мишей, щурів) вивчається в актометрах різних систем з реєстрацією горизонтальних (також вертикальних) переміщень. Найпростішим способом є облік кількості перетинів твариною променів хреста на обмеженій площі за обмежений час (2–3 хвилини) або кількості відвіданих квадратів [2]. Речовина досліджується в 4–6 дозах; дію кожної дози вивчають на 5–6-ти тваринах, результат оцінюється в альтернативній формі. Визначають  $ED_{50} \pm Sx$ . Транквілізатори і нейролептики пригнічують рухову активність. Доза, наприклад, діазепаму в цьому тесті становить  $0,8 \pm 0,05$  мг/кг (миші, внутрішньоочеревишно).

3.2. Вплив на прості природні рефлексі зручно оцінювати, вивчаючи орієнтовну поведінку за кількістю обстежених дір [2] або використовуючи метод «відкритого поля». Рідше використовують «норковий рефлекс» – природний рефлекс уникнення світлого відсіку з переходом тварини до темної камери. Транквілізатори і нейролептики зменшують кількість обстежених

дір і переміщень у «відкритому полі», але збільшують кількість відвідувань центрального (освітленого) кола (квадрата) «відкритого поля», а також час перебування у світлому відсіку і кількість переміщень при вивченні норкового рефлексу. Активність речовини в цих тестах повинна бути істотно вищою, ніж в тестах, що оцінюють міорелаксацію.

3.3. Вплив сполуки на координацію рухів і м'язовий тонус може досліджуватися в тесті зіслизання з похилої площини. Для цього можна використати дрібночарункову сітку, нахилену до поверхні стола на 60°. Переміщення тварин ривками розцінюється як ознака порушеної координації, а зіслизання (за 20 хвилин перебування на сітці) – як міорелаксуючий ефект. Для оцінки цих функцій частіше використовується метод стержня, що обертається [3].

3.4. Вплив на рефлекс перевертання досліджується на мишах, щурах і може бути вивчений на кролях. У разі втрати цього рефлексу необхідно дослідити також больовий, рогівковий рефлекси і рефлекс вушної раковини, пригнічування яких характерне для речовин наркотичного типу дії, але не транквілізаторів.

3.5. Гіпотермічну дію речовини краще дослідити при введенні її під шкіру мишам або щурам. Температуру вимірюють в прямій кишці на глибині 1,5 і 2,5 см за допомогою електротермометра через 30, 60 і 120 хвилин (за необхідності і в більш віддалені терміни). Усереднені результати отримують на групі з 8–10 тварин (для кожної дози). У цих дослідженнях має значення час доби і температура приміщення.

3.6. Взаємодія з судомними отрутами. Обов'язково оцінюється антикоразолова дія, властива багатьом транквілізаторам. Бажане вивчення антагонізму сполуки, що досліджується, з бікукуліном або пікротоксином. Антикоразолова активність звичайно досліджується за [4]. Речовина, що вивчається, в різних дозах вводиться внутрішньоочеревино, коразол (85 мг/кг) – під шкіру спини.

3.7. Взаємодію зі снодійними і наркозними речовинами досліджують на мишах і щурах. У дослідях на мишах вивчають феномен потенціювання гексеналового наркозу. Групам з п'яти-шести тварин вводять воду (внутрішньоочеревино) або різні дози речовини, що досліджується, і через 20 або 30 хвилин гексенал (внутрішньоочеревино в дозі 35 мг/кг). У контрольних тварин (вода) гексенал у цій дозі викликає лише хитку ходу, а на фоні потенціюючої сполуки – бічне положення. Враховують кількість тварин в групі, у яких бічне положення триває не менше 4 хвилин. Визначають ED<sub>50</sub>. У дослідях на щурах досліджують вплив сполуки на тривалість сну або наркозу, викликаного введенням в очеревишну порожнину хлоралгідрату, барбамілу або гексеналу. Снодійні або наркотичні дози цих речовин визначають заздалегідь (контроль).

## 4. Поглиблені доклінічні дослідження (2-й етап)

На цьому етапі вивчається вплив ФЗ на різні типи умовних рефлексів і складні форми поведінки, наприклад, на різноманітні форми поведінки, що караються, зовнішнє гальмування природних або умовних рефлексів, на агресивну поведінку. Транквілізатори і нейролептики ефективні у всіх зазначених тестах. Однак нейролептики, як правило, активніше за транквілізатори пригнічують стійкі умовні рефлекси і агресивну поведінку, тоді як вплив на форми поведінки, що караються, завдають лише в дозах, близьких до міорелаксуючих. На цьому етапі виявляють і кількісно оцінюють каталептогенну, антифенамінову активність ФЗ, маючи на увазі, що ці види активності є типовими для переважної кількості нейролептиків, які нині застосовуються.

4.1. Вплив на умовнорефлекторну діяльність досліджують на щурах, виробляючи у них стабільний умовний рефлекс активного уникнення (УРАУ). Будь-яка конструкція існуючих для цього камер дозволяє поєднувати умовний сигнал з впливом безумовного подразника і забезпечує автоматизовану реєстрацію латентного періоду рефлексу. Як правило, поєднують звуковий сигнал (дзвінок, 15 секунд) з больовим електричним подразненням лап через електродну підлогу (через 5 секунд від початку звучання дзвінка протягом 10 секунд), забезпечуючи тварині можливість уникати больового впливу, виплигуючи на стержень, підвішений в

центрі камери. У цих методичних умовах стійкий УРАУ виробляється за 9–16 поєднань (3–4 сеанси в день, 3–4 дні підряд). Для досліджень відбираються щури, латентний період УРАУ у яких не перевищує 2,5 секунди. У день тестування перевіряють латентний період рефлексу і вводять розчинник (контрольна група) або речовину, що вивчається, а через 30–60 хвилин (залежно від шляху введення) відтворюють УРАУ. Якісно оцінити вплив речовини можна за подовженням латентного періоду рефлексу, але кількісну оцінку активності ФЗ краще представити величиною  $ED_{50}$ , досліджуючи дію 4–5 доз і враховуючи в кожній групі (з 6–8-и тварин) кількість щурів, у яких латентний період УРАУ збільшується щонайменше у 2 рази. У цих дослідженнях можлива оцінка впливу ФЗ на умовний рефлекс (пригнічування уникнення звукового сигналу) і на дію безумовного подразника (пригнічування уникнення больового подразнення). Відношення отриманих при цьому  $ED_{50}$  може служити мірою вибірковості дії речовини.

4.2. Оцінка протитривожної активності речовин базується на використанні експериментальних моделей, які є поведінковими аналогами тривоги. Всі моделі, що використовуються, засновані на впливі зовнішніх або внутрішніх стимулів, що створюють новий емоційно-поведінковий стан, що піддається об'єктивній реєстрації [5]. Одна з таких моделей базується на виробленні у тварин стійкого УРАУ (див. 4.1) і пригніченні умовнорефлекторної реакції впливом могутнього подразника, що раніше не використовується, наприклад, яскравого світла. Зумовлене ним зовнішнє гальмування умовного рефлексу усувається транквілізаторами, але стійке до впливу малих доз нейролептиків.

Для дослідження протитривожної активності широко використовується метод «конфліктної ситуації» в модифікації Т.А.Клигуль і В.А.Криволапова [6]. В умовах цього методу реєструють (за 10–20 хвилин) кількість випадків взяття води і підходів до поїлки, що караються електробольовим подразненням, а також кількість горизонтальних переміщень у щурів з водною депривацією. Досліджуючи на 3–5 групах з 6–10 тварин вплив кількох доз речовини, що вивчається, визначають мінімальну ефективну дозу (МЕД), за яку приймають мінімальну дозу, що збільшує число взяття води не менше, ніж у 2 рази порівняно з контролем (група щурів, яким вводився розчинник).

Метод «загрозливої ситуації», що використовується для вивчення протитривожної активності, базується на реєстрації часу перебування щурів в світлому відсіку камери (що складається з світлого і темного відсіків, сполучених отвором) при електробольовому подразненні щура-жертви, відділеного від піддослідного прозорою перетинкою [7]. Для правильної оцінки протитривожної дії методами конфліктної або загрозливої ситуації необхідна паралельна оцінка впливу речовини на рухову активність тварин.

Аналіз існуючих даних показує, що більшість моделей конфлікту мотивацій досить надійні для прогнозу протитривожного клінічного ефекту потенційних анксиолітиків, а різні їх активності в різних моделях дозволяє скласти певну думку про вірогідний механізм дії [8]. Для оцінки анксиолітичних властивостей ФЗ використовують також моделі зоосоціальної поведінки. Одна з таких моделей базується на тому, що під час утримання щурів по 3 в одній клітці серед них встановлюється соціальна ієрархія, що виявляється суворо певним порядком доступу до смачної їжі. Кількість сеансів споживання їжі підлеглими щурами збільшується при введенні анксиолітиків (хлордіазепоксиду, буспірону), але не галоперидолу [9].

4.3. Вплив ФЗ на агресивну поведінку, зумовлену у мишей або щурів ізоляцією, електричним подразненням через електродну підлогу або руйнуванням (електрокоагуляцією) деяких утворень мозку, властиво як нейролептикам, так і багатьом транквілізаторам. Вплив ФЗ на цю форму поведінки звичайно оцінюють методом «бою щурів» (мишей) на щурах-самцях, яких розміщують попарно в камері з електродною підлогою. Визначивши заздалегідь порогову величину струму, при якому дана пара приймає позу бійців і виявляє агресивність, встановлюють на 4–5 парах дозу речовини, що усуває цей феномен частини або всіх досліджених пар. Оцінивши дію кількох доз, активність виражають величиною  $ED_{50}$ .

4.4. Каталептогенну активність ФЗ оцінюють різними методами. Метод Марпурго [10] враховує збереження протягом визначеного часу вимушеної пози, наданої шуру дослідником, при якій тварина спирається лівою, потім правою передньою кінцівкою на низьку (3 см) і високу (9 см) опору. Сумарна оцінка в 3 бали (0,5+0,5+1+1) свідчить про каталептогенну дію ФЗ. Найбільш просто оцінити час (у секундах) утримання тварини у наданому положенні після розміщення її передніх лап на перекладині (для щурів) або на дроті (для мишей), що знаходяться на відповідній висоті від поверхні. Активність виражають величиною МЕД або ED<sub>50</sub>.

4.5. Антиапоморфінові тести використовуються для прогнозу нейролептичних властивостей сполук, оскільки всі відомі нейролептики (виключення – карбідин) виявляють антагонізм з апоморфіном. Однак, антагонізм з апоморфіном у багатьох тестах виявляють речовини, антипсихотичні властивості яких у клініці не виявлені, наприклад буспірон, що застосовується як анксиолітик. Вивчення антагонізму речовин з апоморфіном дає певну первинну інформацію для міркувань про молекулярні мішені їх дії, оскільки апоморфін у малих дозах активує переважно D<sub>2</sub>-ауторецептори дофамінергічних нейронів, а у великих – постсинаптичні дофамінові рецептори клітин смугастого тіла і відповідно викликає різні ефекти: обмеження рухової активності, седацію і позіхання у щурів при малих дозах (0,01–0,015 мг/кг), а при великих – стереотипію (у щурів) і синдром лазіння (вертикалізації) у мишей.

4.5.1. Синдром лазіння (climbing test) викликається у мишей введенням під шкіру апоморфіну в дозах 0,5–2,0 мг/кг. Він виявляється прагненням тварин, що знаходяться всередині вертикального циліндру з сітки, видиратися на бокову поверхню і зависати на ній [11]. Тривалість висіння пропорційна дозі апоморфіну. Ефект враховується в балах. Активність в цьому тесті оцінюють, досліджуючи вплив кількох доз речовини, що вивчається, і реєструючи число мишей (в групі з 5–6), у яких синдром лазіння слабо виражений або відсутній. Активність виражають величиною ED<sub>50</sub>. Класичні і багато які атипівні нейролептики, але не транквілізатори, усувають цей синдром. Седативні, снодійні засоби і ГАМК-міметики також активні в цьому тесті.

4.5.2. Стереотипна поведінка щурів викликається введенням під шкіру апоморфіну в дозі 0,3–1,0 мг/кг. Вона виявляється нюханням, жуванням, лизанням. Необхідно визначити дозу апоморфіну, яка у щурів даної популяції викликає інтенсивну стереотипію, що виникає періодично, або менш інтенсивну, але постійну (2 бали за 3-бальною шкалою). Після введення нейролептиків стереотипна поведінка усувається або виникають лише окремі стереотипні рухи. Шляхом реєстрації кількості тварин у групі, у яких після введення речовини апоморфін не викликає стереотипії, і вивчення дії речовини в 4–5 дозах визначають ED<sub>50</sub>.

4.5.3. Феномен седації і позіхання виникає у мишей і щурів-самців при введенні під шкіру апоморфіну в дозах 0,03–0,12 мг/кг. Після введення апоморфіну в дозі 0,1 мг/кг кількість позіхань за 1 годину спостереження становить у щурів-самців 10–20. Речовини з нейролептичною активністю в тих дозах, у яких вони не змінюють спонтанної рухової активності, відновлюють локомоцію і ліквідують позіхання або зменшують їх кількість.

4.5.4. Апоморфін відомий як активатор D<sub>2</sub>-рецепторів дофаміну нейронів тригерної зони блювотного центру і сильний блювотний засіб. У собак апоморфіну гідрохлорид викликає блювоту при внутрішньовенному введенні у дозі 0,045 мг/кг, під шкіру – в дозі 0,5–1,0 мг/кг. Протиблювотну дію речовини, що досліджується, у собак можна кількісно охарактеризувати величиною МЕД. Протиблювотну дію ФЗ зручніше і економічно доцільніше оцінювати на голубах. У нагодованих зерном голубів масою 300–400 г внутрішньоочеревинне введення апоморфіну в дозі 15 мг/кг через 3–7 хвилин викликає реакцію у вигляді мотання головою і відригування зерна. Звичайно спостерігаються 2–5 таких епізодів. Речовину, що досліджується, вводять за 30 хвилин до апоморфіну внутрішньоочеревинно. Реєструють в групі з 5 птахів середню кількість блювотних актів і кількість птахів в групі, у яких блювота не виникла. Вивчення дії речовини в 3–5 дозах дозволяє оцінити її активність величиною ED<sub>50</sub> [12]. Вивчення впливу ФЗ на фенамінову гіперактивність або стереотипію у гризунів не є обов'язковим, оскільки не дає додаткової інформації порівняно з апоморфіновими тестами.

4.6. Виконання електрофізіологічних досліджень бажане при оцінці фармакологічних ефектів потенційних транквілізаторів або нейролептиків. Однак рутинна характеристика їх впливу на ЕЕГ або викликані потенціали мало інформативна. Вона служить лише основою для висновку про депримуєчий або збуджуючий характер дії речовини на ЦНС. Інформативним з точки зору можливості диференціювання транквілізаторів від інших груп психоактивних засобів є аналіз спектрів потужності ЕЕГ. Показано, що анксиолітики (бензодіазепіни і буспірон) мають спільний, відмінний від психостимуляторів, нейролептиків і ноотропів, характер впливу на біоелектричну активність сенсорної кори і дорсального гіпокампу мозку шурів. Анксиолітики сповільнюють тета-ритмічну активність, збільшують високочастотну активність у діапазоні 12–32 Гц, спричиняють появу високоамплітудної активності з частотою 12–16 Гц [13, 14]. Вивчення впливу ФЗ на тривалість міжімпульсних інтервалів при дослідженні, наприклад, транскалозальних відповідей [15] або використання стандартної мікроелектродної техніки для реєстрації впливу речовин на рівень мембранного потенціалу і вхідний опір [16], дають корисну інформацію про характер впливу на нервові клітини мозку і його можливу роль в психотропних ефектах речовини, що досліджується. Однак, експерименти такого роду швидше відносяться до третього етапу доклінічних досліджень.

### 5. Уточнюючі доклінічні дослідження (3-й етап)

На цьому етапі виконуються головним чином нейрофізіологічні і нейрохімічні дослідження, які корисні, а іноді необхідні для визначення кола тих показань, у рамках яких доцільне проведення майбутніх клінічних випробувань нового ФЗ. Хоч безсумнівно, що будь-яка психічна функція формується за участю багатьох структур мозку і багатьох нейрохімічних процесів, не викликає сумніву і те, що корекція кожного психопатологічного симптому (тривоги, порушеного сприйняття, мислення, пам'яті і т.п.) досягається впливом на головну для цього симптому нейрохімічну мішень. Такою мішенню для анксиолітиків є ГАМК-ергічні і/або серотонінергічні, для нейролептиків – дофамінергічні процеси в мозку. Прямий доказ впливу ФЗ, що вивчається, на ці процеси є змістом третього етапу досліджень.

5.1. Нейрофізіологічні дослідження можуть виконуватися загальноприйнятими методами [17] на мозку (шурів, кролів) *in situ*, на зрізах мозку або одиночних нейронах *in vitro* з поза- або внутрішньоклітинною реєстрацією спонтанної або викликані активності нейронів, мембранного потенціалу та інших параметрів. Мета дослідження полягає в тому, щоб оцінити характер впливу речовини, що вивчається, на функцію нейронів певної структури мозку, здатність полегшувати або утруднювати їх спонтанну або викликану активність [18], а також виявити межі схожості в дії медіатора і речовини, що досліджується, або з'ясувати вплив ФЗ на ефекти медіаторів: ГАМК, серотоніну, дофаміну, глутамату. У зв'язку з трудомісткістю цих досліджень їх часто проводять за скороченою програмою, беручи до уваги, що дані про вплив ФЗ на чутливість нейронів до медіаторів і про рецепторні мішені його дії можуть бути отримані у нейрохімічних експериментах.

5.2.1. Можливість пресинаптичної або іншої локалізації дії ФЗ звичайно оцінюють в дослідках на тонких зрізах певних утворень мозку, які преінкубують з [<sup>3</sup>H]-серотоніном (зрізи кори півкуль, дорсальних ядер шва), [<sup>3</sup>H]-дофаміном (зрізи хвостатого ядра) або [<sup>3</sup>H]-ГАМК (зрізи кори півкуль, смугастого тіла). Вивчають вплив ФЗ на спонтанне (базальне) і викликане іонами калію [19] або електричною стимуляцією [20] вивільнення зрізами радіоактивної мітки, або вплив речовини на зумовлене медіатором гальмування пресинаптичного вивільнення міченого медіатора.

5.2.2. Дослідження впливу на метаболічний оборот дофаміну і серотоніну в мозку дозволяє оцінити речовину, що вивчається, як потенційний нейролептик. Відомо, що класичні і атипичні нейролептики при одноразовому їх введенні внаслідок блокади D<sub>2</sub>-рецепторів дофамінергічних нейронів, посилюють вивільнення і метаболічний обіг дофаміну, збільшуючи

вміст діоксифенілоцтової і гомованілінової кислот у смугастому тілі та прилеглому до перетинки ядрі, водночас знижуючи вміст в мозку метаболіту серотоніну 5-оксіндолоцтової кислоти. Для кількісного визначення дофаміну, серотоніну та їх метаболітів використовують метод газорідинної хроматографії або вольтаметрії [21], або спосіб, заснований на розділенні амінів та їх метаболітів гельфільтрацією в колонках, заповнених сефадексом G-10 [22]. Слід однак брати до уваги, що буспірон, позбавлений антимаревної і антигалюцинаторної дії, викликає такі ж зміни вмісту дофаміну, серотоніну і їх метаболітів в мозку, як і типові нейролептики [23].

5.2.3. Вивчення впливу ФЗ на специфічне зв'язування радіолігандів найважливішими рецепторами ( $D_2$ , 5-НТ<sub>1A</sub>, бензодіазепіновими), що мають відношення до ефектів нейролептиків і анксиолітиків, дозволяє в прямих експериментах визначити вірогідний молекулярний субстрат дії і кількісно охарактеризувати міру спорідненості до нього сполуки, що вивчається. У лабораторіях, де радіолігандні дослідження поставлені «на потік», вони є основою скринінгу хімічних речовин.

Радіолігандні дослідження краще виконувати, маючи мічену речовину, що досліджується [24]. Однак її синтез стає економічно доцільним на етапі клінічних досліджень. На доклінічному етапі вивчають вплив неміченої сполуки на зв'язування з синаптосомами мозку специфічних мічених лігандів: [<sup>3</sup>H]-флунітразепаму (ліганд бензодіазепінових рецепторів), [<sup>3</sup>H]-спіперону (ліганд  $D_2$  дофамінових і 5-НТ<sub>2</sub> рецепторів), [<sup>3</sup>H]-іпсапірону (ліганд 5-НТ<sub>1A</sub> рецепторів). Вивчають вплив ФЗ на зв'язування цих мічених лігандів мембранами різних структур мозку – стріатума, гіпокампа, фронтальної кори. У дослідях з міченим спіпероном стріатум розглядають як джерело  $D_2$ , а кору – як джерело 5-НТ<sub>2</sub> рецепторів.

Відразу після декапітації виділяють на льоду з мозку кількох щурів необхідні структури мозку, зважують і гомогенізують в 32-кратному об'ємі 50 мМ ТРИС буфера (рН = 7,4) у скляно-тефлоновому гомогенізаторі на льоду. Гомогенат центрифугують при 30000 g 20 хвилин. Осад, що утворився, ресуспендують у тому ж буфері і центрифугують повторно. Кінцевий осадок розчиняють в тому ж буфері так, щоб вміст білка в пробі становив 0,15 мг. Зв'язування [<sup>3</sup>H]-флунітразепаму (0,125 нМ) вивчають при загальному об'ємі інкубації 500 мкл. Неспецифічне зв'язування визначають в присутності 10 мкМ флунітразепаму. Речовину, що досліджується, використовують у кількох концентраціях (від  $10^{-10}$  до  $10^{-4}$  М). Після 60 хвилин інкубації (на льоду) реакцію у всіх тест-тубах зупиняють швидкою фільтрацією через скловолокнисті фільтри GF/B (фірми Whatman). Фільтри тричі промивають охолодженим буфером. За добу до вимірювання радіоактивності фільтри вміщуються в 5 мл сцинтиляційної рідини (ACS). Радіоактивність вимірюють за допомогою рідинного сцинтиляційного лічильника і визначають  $IC_{50}$  – концентрацію речовини, яка пригнічує специфічне зв'язування [<sup>3</sup>H]-флунітразепаму на 50% [25]. За аналогічних умов здійснюють інкубацію суспензії мембран з міченим спіпероном (кінцева концентрація 0,1–0,25 нМ) або [<sup>3</sup>H]-іпсапіроном (2 нМ) за відсутності та в присутності різних концентрацій речовини, що досліджується. Якщо величини  $IC_{50}$  речовини, що вивчається, вимірюються в наномольних концентраціях, висновок про високу спорідненість сполуки до відповідних міченому ліганду рецепторів є коректним.

До розділу уточнюючих досліджень психодепресантів бажано включити оцінку можливого розвитку толерантності і залежності при тривалому застосуванні ФЗ, що вивчається. Швидкість розвитку толерантності до потенційних транквілізаторів і нейролептиків звичайно оцінюється за кількома ефектами: порушенням координації рухів, рефлексу перевертання, антикоразоловому і анксиолітичному. Визначають  $ED_{50}$  або МЕД, що характеризують кожний з цих видів активності у щурів, яким речовина, що досліджується, вводилася 14–15 і 28–30 днів щодня. Ці  $ED_{50}$  (МЕД) співвідносяться з дозами, визначеними при одноразовому введенні ФЗ [26]. Толерантність може виявлятися тільки в одному або в декількох тестах.

Найбільш високу прогностичну цінність при доклінічній оцінці наркогенної безпечності (небезпечності) психоактивних засобів має, за загальним визнанням (див. [27]), метод внут-

рішньовенного самовведення. Технічне забезпечення цього методу викладене в [28]. Основа методу полягає в тому, що в камері Скіннера щурів навчають натисненню на педаль для отримання харчового підкріплення. Після вироблення сталої навички харчове підкріплення замінюють внутрішньовенним самовведенням 10–20 мкл розчину речовини. За відсутності у ФЗ наркогенної активності придбана навичка натиснення педалі згасає. Якщо ФЗ має таку активність, навичка зберігається. Враховують кількість самовведень за 2 або 4 години досліду, загальну дозу введеної речовини, а також наявність стереотипної поведінки. Досліди виконуються на щурах, заздалегідь оперованих з метою імплантації поліетиленового катетера в яремну вену і виведення кінця катетера у потиличну область.

## 6. Кілька зауважень до вивчення загальної фармакологічної активності

Доклінічні дослідження загальної фармакологічної активності ФЗ переслідують свої цілі [1], найважливіша з яких полягає в оцінці його впливу на життєво важливі системи і органи. Разом з тим вивчення загальної активності нової сполуки включає елементи, які можуть полегшити розв'язання питання про приналежність речовини, що досліджується, до групи нейролептиків або транквілізаторів.

Відомо, що, на відміну від більшості транквілізаторів, нейролептики впливають на вегетативну нервову систему. Тому важливо оцінити вплив речовини, що вивчається, на реакції серцево-судинної системи, зумовлені ацетилхоліном, цититином, норадреналіном, серотоніном, а також подразненням периферичного відрізка блукаючого нерва і реакцію мигальної перетинки (у кішок) на подразнення шийного симпатичного стовбура. Важливо оцінити також центральні холінолітичні властивості, що виявляються за здатністю речовини попереджати або усувати гіперкінези і судоми, зумовлені введенням акреоліну або окситреморину, нікотину. Наявність якихось з цих видів активності повинна спонукати до більш детального вивчення (на нервових клітинах) холінолітичних, антисеротонінових і антигістамінних властивостей, що відіграють суттєву роль в антипсихотичних ефектах нейролептиків [29].

## Література

1. Методические рекомендации по представлению документации на лекарственные средства в ФК МЗ Украины.– К., 1993.– 40 с.
2. Boissier J.P., Simon P. Dissociation de deux composantes dans le comportement divestigation de souris//Arch. Int. Pharmacodyn.– 1964.– V.143, №3–4.– P. 372–387.
3. Dunham N.W., Mija T.S. A note on a simple apparatus for detecting neurological deficit in rat and mice//J. Am. Pharmacol. Sci.– 1957.– V.46, №3.– P. 208–209.
4. Swinjard E.A. Comparative assais of antiepileptic drugs in mice and rats//J. Pharmacol. Exp. Therap.– 1952.– V.106, №3.– P. 319–330.
5. Бета-карболины. Химия и нейробиология/Дуленко В.И. и др.– К.: Наук. думка, 1992.– 216 с. (с. 110).
6. Клыгуль Т.А., Криволапов В.А. Установка с автоматической регистрацией поведения крыс для экспериментальной оценки действия малых транквилизаторов//Фармакол. и токсикол.– 1966.– Т.29, №2.– С. 211–214.
7. Талалаенко А.Н., Зиньковская Л.Я. Особенности анксиолитического действия производных бензодиазепина и ГАМК на экспериментально моделируемые состояния тревоги//Фармакол. и токсикол.– 1988.– Т.51, №4.– С. 20–22.
8. Cook L. Animal psychopharmacological models: use of conflict behaviour redicting clinical effects of anxiolytics and their mechanism of action//Prog. Neuro-Psychopharmacol. Biol. Psychiatry.– 1982.– V.6, №4–6.– P. 579–583.

9. Sander D.J., Joly D. Social competition in rats: a sensitive test anxiolytic and anxiogenic drugs//J. Psychopharmacol.– 1992.– V.6, №1.– P. 141.
10. Morpurgo C. Effects of antiparkinsons drugs on a phenothiazine induced catotonic reaction//Arch. Int. Pharmacodyn.– 1962.– V.137, №1–2.– P. 84–90.
11. Protais P., Costentin J., Schwartz J.C. Climbing behaviour induced by apomorphine in mice: a simple test for the study of dopamine receptors in striatum//Psychopharmacol.– 1976.– V.50, №1.– P. 1–6.
12. Налетов С.В., Климчук Т.И., Комиссаров И.В. Голубь как объект для оценки активности веществ при рвоте различного генеза//Эксперим. и клин. фармакол.– 1993.– Т.56, №4.– С. 60–61.
13. Богданов Н.Н., Воронина Т.А. Взаимосвязь анксиолитического эффекта диазепама и изменений спектров мощности ЭЭГ крыс//Бюлл. эксперим. биол. и мед.– 1989.– №8.– С. 199–202.
14. Богданов Н.Н. Количественные ЭЭГ корреляты анксиолитического эффекта транквилизаторов: Автореф. дисс.... канд. мед. наук.– М., 1990.
15. Zakusov V.V., Ostrovskaya R.U., Markovitch V. et al. Electrophysiological evidence for an inhibitory action of diazepam upon cat brain cortex//Arch. Int. Pharmacodyn.– 1975.– V.214, №2.– P. 188–205.
16. Абрамец И.И., Самойлович И.М. Анализ природы ответов спинальных ганглиев крыс, вызываемых активацией ГАМК-рецепторов//Физиол. журн. СССР.– 1989.– Т.75, №3.– С. 305–310.
17. Бурен Я., Петрань М., Захар И. Электрофизиологические методы исследования.– М.: ИЛ, 1962.
18. Trulson M.E., Arasteh K. Buspirone decrease the activity of 5-hydroxytryptamine containing dorsal raphe neurons in vitro//J. Pharm. and Pharmacol.– 1986. – V.36, № 5. – P. 380–382.
19. Mounsey I., Brady K.A., Carroll J. et al. K-evoked 5-HT release from rat frontal cortex slices: effect of 5-HT agonists and antagonists//Biochem. Pharmacol.– 1982.– V.31, №1.– P. 49–53.
20. Долженко А.Т., Комиссаров И.В., Харин Н.А. Сравнительное влияние агонистов серотонина на пресинаптические и соматодендритные ауторецепторы серотонинергических нейронов//Бюлл. эксперим. биол. и мед.– 1989.– №12.– С. 684–686.
21. Maidment N.T., Marsden C.A. Acute administration of clozapine and metoclopramide increases extracellular DOPAC and decrease 5-HIAA, measured in the nucleus accumbens and striatum of the rat//Neuropharmacol.– 1987.– V.26, №1.– P. 187–193.
22. Early C., Leonard B.E. Isolation and assay of noradrenaline, dopamine, 5-hydroxytryptamine and several metabolites using disposable Bio-Rad columns packed with Sephadex G-10//J. Pharmacol. Meth.– 1978.– V.1, №1.– P. 67–79.
23. Fuller R.W., Perry R.W. Effects of buspirone and its metabolite on brain monoamines and their metabolites in rats//J. Pharmacol. Exp. Ther.– 1989.– V.248, №1.– P. 50–56.
24. Якубовская Л.Н., Богатский А.В., Андронати С.А. и др. Синтез феназепама-С14 и его потенциальных метаболитов//Хим.-фарм. журн.– 1979.– Т.13, №2.– С. 85–89.
25. Saano V. Affinity of various compounds for benzodiazepine binding sites in rat brain, heart and kidneys in vitro//Arch. Pharmacol. Toxicol.– 1986.– V.58, №3.– P. 333–338.
26. Клыгуль Т.А. Особенности развития толерантности к нитразепаму и фенобарбиталу в эксперименте//Фармакол. и токсикол.– 1976.– Т.39, №5.– С. 532–536.
27. Вальдман А.В., Бабаян Э.А., Звартау Э.Э. Психо-фармакологические и медико-правовые аспекты токсикоманий.– М.: Медицина, 1988.– 288 с.
28. Звартау Э.Э. Простая модификация метода внутривенного самовведения лекарственных веществ экспериментальным животным//Журн. высш. нервн. деят.– 1979.– №4.– С. 877–879.
29. Комиссаров И.В., Абрамец И.И. Новый взгляд на молекулярные механизмы действия психофармакологических средств//Арх. клин. и эксперим. медицины.– 1993.– Т.2, №1.– С. 6–12.



## ДОКЛІНІЧНЕ ВИВЧЕННЯ СПЕЦИФІЧНОЇ АКТИВНОСТІ ПРОТИПУХЛИННИХ ЗАСОБІВ

Шарикіна Н.І.,  
Шляховенко В.О.,  
Мосієнко В.С.,  
Кулік Г.І.,  
Бардик Ю.В.

### 1. Загальні положення

Пошук протипухлинних препаратів передбачає кілька етапів.

Перший етап – потенційні (активні у протипухлинному відношенні) хімічні та біологічні речовини проходять первинний відбір (прескринінг). На цьому етапі в модельних системах *in vitro* та частково *in vivo* на доступних моделях пухлинного росту встановлюється цитостатична та цитотоксична дія речовини, а також можуть вивчатися окремі ланки молекулярного механізму цитостатичного ефекту досліджуваної речовини. Позитивні результати досліджень на цьому етапі дають підставу для подальшого дослідження протипухлинної активності та переходу до другого етапу.

Другий етап (первинний скринінг) – передбачає вивчення протипухлинної активності досліджуваної речовини на сигнальних обов'язкових моделях експериментальних пухлин (2–4 штами).

Третій етап – передбачає поглиблене вивчення досліджуваної речовини на широкому спектрі пухлин з метою вивчення спектру протипухлинної та антилейкозної дії речовини: дослідження залежності ефекту від дози, дослідження оптимальних шляхів та режимів застосування, встановлення вибірковості дії.

З метою уточнення показань до застосування препарату для пухлин різних локалізацій та генезу можна провести дослідження *in vitro* на культурах пухлин людини, ксенографтах, використати підкапсульний тест.

Вирішення питання про доцільність проведення клінічних випробувань робиться на підставі затверджених фармакологічних критеріїв, яким повинен відповідати досліджуваний засіб, зі зверненням особливої уваги на вплив ФАР на органи і тканини з активною проліферацією.

Передумовою для пропозиції щодо клінічного вивчення нового препарату має бути суттєва та відтворювана протипухлинна активність.

При вивченні специфічної (протипухлинної) активності речовини має пройти певний шлях.

Первинний прескринінг може проводитися на модельних системах *in vitro*: мікробіологічних, первинних та стаціонарних культурах нормальних та пухлинних клітин, деяких ферментативних та інших тестах. Крім того, бажано провести дослідження на кількох (2–3) доступних моделях пухлинного росту у тварин.

Первинний відбір речовин для подальшого поглибленого вивчення протипухлинної активності має бути проведений на обов'язковому спектрі пухлин.

Моделі, використані для первинного відбору, повинні мати чутливість до різних за хімічною структурою та механізмом дії препаратів.

Перевагу слід віддати пухлинам мишей, оскільки більшість пухлин щурів мають вибіркочувливість до препаратів алкілюючої дії. Крім того, для дослідження на мишах потрібна менша кількість речовини та менша кількість тварин.

Багато, щоб первинний відбір протипухлинних препаратів проводився з використанням як пухлинних, так і лейкозних штамів. Крім чутливих до існуючих препаратів штамів пухлин, багато включати також малочутливі.

Обов'язковим для первинного відбору є проведення досліджень на моделях лейкозу Р388 або L1210, саркомі Льюїса або меланомі В16 та карциномі 755 або карциносаркомі Уокера [3].

Критеріями оцінки протипухлинного ефекту є повне вилікування, процент гальмування росту пухлини (ГРП) та збільшення тривалості життя (ЗТЖ).

Критерієм протипухлинної активності для асцитних форм пухлин є збільшення тривалості життя лікованих тварин у % до контролю.

Як позитивний, враховується показник ЗТЖ >25%.

Критерієм протипухлинної активності для солідних штамів пухлин є оцінка гальмування росту пухлини за масою чи об'ємом у % до контролю або ЗТЖ.

Як позитивний, враховується показник гальмування росту пухлини >50%.

При отриманні позитивних результатів хоча б на одній з рекомендованих моделей речовина заслуговує на подальше поглиблене вивчення протипухлинної активності.

Для поглибленого вивчення протипухлинної активності рекомендуються наступні штами перещепних пухлин мишей та щурів: L1210, Р388, Са755, карцинома Ерліха, саркома 180, гемоцитобластоз La, АКАТОЛ, лімфосаркома Пліса, карциносаркома Уокера, саркома 45 [3, 4].

Для оцінки специфічної протипухлинної активності ресинтезованих відомих препаратів або створення лікарських форм препаратів з імпортою субстанції дослідження проводяться не менше ніж на 3 штаммах, найбільш чутливих до даного препарату.

## **2. Оцінка протипухлинної дії**

1. Ефективність дії препаратів нових класів повинна відповідати одному з таких критеріїв [3]:

- 1.1. Гальмування росту хоча б 1 солідної пухлини на 90% (не менше, ніж повна зупинка росту), що зберігається протягом 1 тижня після відміни препарату;
- 1.2. Гальмування росту не менше ніж 3 солідних пухлин >70% із збереженням значущого ефекту протягом не менше 1 тижня після відміни препарату;
- 1.3. Збільшення тривалості життя лікованих тварин з лейкозом >25–50%;
- 1.4. Збільшення тривалості життя тварин із солідними пухлинами не менше ніж на 50%;
- 1.5. Вилікування >30% тварин із солідними пухлинами або лейкозами.

2. Препарати, що відносяться до відомих класів протипухлинних агентів, повинні порівнюватися з кращими світовими зірцями того ж класу. У випадку неможливості паралельного включення таких речовин у досліді проводиться порівняльне дослідження з близькими за структурою препаратами, що використовуються в клініці.

У такому випадку відомості про кращі світові зірці даного класу наводяться у літературній довідці.

Пропоновані до клінічного вивчення нові аналоги повинні або істотно відрізнятися від відомих за спектром протипухлинної дії, механізмом дії, фармакокінетикою, або ж мати істотну перевагу перед кращими світовими зірцями цього класу чи кращими препаратами цього класу.

2.1. Відмінності в спектрі протипухлинної дії повинні полягати в істотній (у відповідності з вказаними вимогами) протипухлинній активності при пухлинах, нечутливих до вихідного препарату, або у повній відсутності протипухлинної активності на пухлинах, високочутливих до вихідної речовини, при наявності активності у відношенні до інших моделей, або в істотно-

му збільшенні широти спектру протипухлинної дії на моделях, чутливих до препаратів з різним механізмом дії (пропонований набір пухлинних штамів відповідає цій вимозі).

2.2. Відмінності у механізмі дії чи фармакокінетиці повинні поєднуватись або із збільшенням вибіркової протипухлинної дії (збільшення терапевтичної широти) при тому ж спектрі дії (у 2 рази більше для найбільш чутливих пухлин) або із зміною спектру протипухлинної дії (у відповідності з протипухлинною активністю).

2.3. Переваги нового препарату можуть бути представлені хоча б одним із таких показників:

2.3.1. Збільшення протипухлинної активності препарату не менше ніж у 2 рази із збільшенням тривалості життя або вилікування чи виявлення здатності збільшувати тривалість життя >50% або виліковувати >30% тварин при відсутності цих властивостей у вихідного препарату (без підвищення) токсичності.

2.3.2. Для аналогів препаратів, що мають важкі побічні ефекти, відсутність цих токсичних ефектів (наприклад, відсутність нефротоксичності для комплексних сполук платини, відсутність кардіотоксичності для аналогів антрациклінових антибіотиків і т.п.).

2.3.3. Суттєва активність при пухлинах з лікарською резистентністю до вихідного препарату, або підвищена чутливість до нового препарату пухлин, стійких до якого-небудь відомого широко вживаного протипухлинного препарату (колатеральна чутливість).

2.3.4. Виражений протиметастатичний ефект препарату при відсутності такого у вихідного аналогу або збільшення антиметастатичного ефекту не менш як у 2 рази [3].

2.3.5. Можливість використання більш зручних, безпечних та менш неприємних для хворого шляхів введення препарату порівняно з відомими ефективними аналогами при такій же ефективності лікування.

### 3. Модифікатори біологічної дії

3.1. Модифікатори біологічної дії, що виявляють протипухлинний ефект (гальмування росту 1 солідної пухлини на >90%, або гальмування росту не менш ніж 3 солідних пухлин на >70%, або збільшення тривалості життя з солідними пухлинами на >25%, з лейкозами на >75%, або вилікування >30% тварин з пухлинами або лейкозами), пропонуються для вивчення в онкологічній клініці як протипухлинні препарати. Ці речовини можуть також пропонуватись для випробувань в клініках іншого профілю як імуномодулятори, протизапальні агенти, речовини, що сприяють регенерації і т.д. Надалі подібні препарати можуть використовуватись в онкологічній клініці. «за новим призначенням» (як модифікатори протипухлинного або токсичного ефекту).

3.2. Модифікатори біологічної дії, що не виявляють протипухлинного ефекту, випробовуються в клініках відповідно до їх фармакологічної дії, а потім можуть бути запропоновані для випробувань в онкологічній клініці як модифікуючі фактори.

3.3. Пропозиція про випробування модифікаторів біологічної дії, що не виявляють протипухлинного ефекту, в клініці повинна ґрунтуватись на підтвердженні наявності біологічної дії, здатної підвищити протипухлинний ефект лікувальних заходів (вибірковість протипухлинної дії) та даних, що підтверджують перевагу комбінованого використання модифікатора з протипухлинним фактором.

Протипухлинна ефективність при цьому повинна збільшуватись не менше ніж у 2 рази при збільшенні тривалості життя або проценту вилікування, або ж у комбінації повинна з'явитись здатність збільшувати тривалість життя >50%, або виліковувати >30% тварин при відсутності цих властивостей у протипухлинного фактора (без зростання токсичності).

4. Для відтворюваних зарубіжних препаратів повинні бути представлені матеріали, що підтверджують ідентичність відтвореного лікарського засобу та вихідного агента за протипухлинною дією (на 2–3 штамах пухлин) та іншими характерними біологічними ефектами (із застосуванням відповідних методів).

5. Запропоновані для клінічного вивчення препарати повинні мати достатню вибірковість протипухлинної дії: виявляти протипухлинний ефект в дозах, не менше ніж у 1,5 раза нижчих порівняно з максимально переносимими; мати терапевтичну широту, що забезпечує можливість одержання лікувального ефекту у дозах, які не викликають токсичного ефекту; або токсична дія яких незначна. Для визначення терапевтичної широти пропонується використовувати відношення величини оптимальної дози до дози, що забезпечує збільшення тривалості життя тварин на 25%, або гальмує ріст пухлини на 50%. Величини цих доз визначаються графічно. Індекс, що визначає терапевтичну широту, повинен бути не меншим 2.

6. Звіт про вивчення специфічної (протипухлинної) активності повинен відображати результати дослідження таких питань.

6.1. Залежність протипухлинного ефекту та загибелі тварин від дози.

6.2. Докази оптимальності запропонованого способу введення препарату.

6.3. Залежність протипухлинного ефекту та загибелі тварин від режиму застосування препарату.

6.4. Спектр протипухлинної дії препарату з обов'язковим використанням моделей, вказаних у п.1.

6.5. Результати досліджень дії препарату на пухлини у ранні та пізні строки після перещеплення.

6.6. Встановлення вибірковості протипухлинної дії.

6.7. Експериментальні докази (хоча б на одній моделі пухлин) ефективності обраної лікарської форми препарату.

6.8. Якщо однією з головних передумов для пропозиції про клінічне вивчення препарату є особливості механізму дії, звіт про вивчення протипухлинної активності повинен включати ці дані.

7. Бажано включати у звіт про вивчення специфічної (протипухлинної) активності наступне.

7.1. Дані про механізм дії препарату.

7.2. Дані про вплив препарату на метастазування та ріст метастазів.

7.3. Відомості про динаміку протипухлинного ефекту протягом введення та після відміни препарату аж до загибелі тварин, або терміну, що забезпечує висновок про вилікування тварин від пухлин (60 днів для пухлин, які призводять до загибелі протягом 7–10 днів; не менше як 90 днів – для пухлин, що ведуть до загибелі протягом 25–30 днів).

7.4. Дані про дію препарату на клітинний цикл, наявність або відсутність цикло- або фазо-специфічної дії препарату.

7.5. Дані про фармакокінетику препарату.

8. Для прогнозування ефекту препарату в клініці бажано включити у звіт наступне.

8.1. Для препаратів з очікуваною спрямованою дією на певні види пухлин (наприклад, гормонально активних) – дані, що підтверджують наявність такої спрямованості з використанням відповідних методів та моделей.

8.2. Результати вивчення дії препарату на пухлини людини *in vivo* (гетеротрансплантати) або *in vitro*.

8.3. Результати математичного прогнозування спектру протипухлинної дії препарату в клініці на основі експериментальних даних.

9. У зв'язку із зростаючою ефективністю терапії пухлинних захворювань та перспективами збільшення тривалості життя людей, вилікуваних від пухлин, все більшого значення набувають дослідження мутагенності та тератогенності протипухлинних препаратів. Наявність таких даних у звіті є бажаною, і з часом буде набувати все більшого значення.

10. Матеріали, що стосуються способів підвищення вибірковості протипухлинної дії нового препарату, можливості його комбінування з іншими протипухлинними препаратами, іншими лікарськими впливами чи біологічними модифікаторами, не можуть правити за основу для рекомендації про проведення клінічних випробувань речовин, якщо вона як така не відповідає вимогам, які ставляться до протипухлинних препаратів.

### 3. Методика досліджень

1. Препарат вводиться залежно від його властивостей і завдань досліджу в черевну порожнину, внутрішньовенно, під шкіру, внутрішньом'язово або всередину.

2. Маса тіла тварин – оптимальна для мишей 18–25 г, для щурів 120–160 г.

3. Вік тварин – миші 1,5–2,5 місяці, щури – 1,5–2,0 місяці.

4. Стать: тварини однієї статі для всіх груп з одним контролем.

5. Кількість тварин в контрольній групі залежить від кількості дослідних груп і обраховується за формулою:

$\sqrt{\text{кількість дослідних груп} \cdot \text{кількість тварин у кожній дослідній групі}}$ .

6. Дози – у першому досліді, якщо не відомі токсичні дози речовини, її застосовують не менше ніж у трьох дозах, що відрізняються між собою у кілька разів. В наступних дослідіх дози коригують в залежності від результатів першого досліді до визначення оптимальної дози.

7. Процент збільшення тривалості життя обчислюється за формулою:

$$\frac{\text{середня тривалість життя в дослідній групі} - \text{середня тривалість життя в контролі}}{\text{середня тривалість життя в контролі}} \cdot 100\%$$

8. Процент гальмування росту пухлини (за масою, об'ємом пухлини, за об'ємом асцити або за кількістю пухлинних клітин) обчислюється за формулою:

$$\frac{\text{середній показник росту пухлини в контролі} - \text{середній показник росту пухлини в дослідній групі}}{\text{середній показник росту пухлини в контролі}} \cdot 100\%$$

9. Досліди мають проводитись на тваринах обох статей, але в одному досліді мають бути тварини однієї статі.

Введення досліджуваної речовини починається в різні строки після перещеплення пухлини залежно від її особливостей та властивостей досліджуваної речовини.

Оцінка терапевтичного ефекту проводиться, як правило, на 2-й день після закінчення введення досліджуваної речовини. Можна проводити динамічне дослідження росту пухлини під час лікування та після його закінчення протягом не менше 7 днів. При цьому використовується оцінка гальмування росту пухлин за об'ємом, який вимірюється 3-ма діаметрами та вираховується за формулою ГРП.

Для виявлення відстроченого терапевтичного та токсичного ефектів тварин залишають під наглядом не менше ніж на 7 днів.

### 4. Характеристика штамів, які рекомендуються для доклінічних досліджень протипухлинних засобів [3, 4]

#### Лімфоїдний лейкоз L1210

Походження. В 1948 р. індукований у селезінці та лімфатичних вузлах мишей-самців DBA/2 шляхом змащування шкіри метилхолантреном.

Загальні відомості. Асцитна рідина вводиться мишам DBA/2, BDF<sub>1</sub> або CDF<sub>1</sub>.

Лікування починається через 24–48 годин після прищеплення.

## **Оцінка специфічної фармакологічної активності лікарських засобів**

Ефективність оцінюється за ЗТЖ. Кожна тварина при підтримці штаму отримує 0,25 мл асцити, розведеного розчином Хенкса у відношенні 1:60, в черевну порожнину. Термін прищеплення – 6–7 день.

Для випробувань кожна тварина отримує  $10^5$ – $10^6$  лейкозних клітин в об'ємі 0,2–0,3 мл, розведеного стерильним цитратом та середовищем 199 або фізіологічним розчином.

Кількість тварин – у дослідній групі – 6; – у контрольній групі – 6–10 тварин.

Середній термін життя контрольних тварин становить 7–9 або 8–11 днів залежно від кількості прищеплених клітин.

Мінімальний критерій активності > 25%.

Кінцевий день оцінки – 60–90-й.

### **Епідермоїдна карцинома легенів Льюїса (LL)**

Походження. Карцинома легенів виникла спонтанно у мишей C57B1 в 1951 р.

Загальні відомості. Перещеплення під шкіру суспензією пухлинної тканини мишам лінії C57B1 або гібридам BDF<sub>1</sub>.

Лікування починається через 24–48 годин після трансплантації. Параметрами ефекту є ГРП чи ЗТЖ.

Прищеплення. Кожна тварина внутрішньом'язово отримує 0,2–0,3 мл пухлинної суспензії в розчині Хенкса у співвідношенні 1:2, або  $1 \cdot 10^6$  клітин.

Час прищеплення: 11–12 день.

Прищеплення для дослідів. Кожна тварина отримує під шкіру у пахвинну ділянку тіла 0,5 мл пухлинної суспензії при розведенні 1 г пухлини в 10 мл стерильного середовища 199. Термін прищеплення – 12–14 день.

Кількість тварин в контрольній групі – 12–14.

Кількість тварин в дослідній групі – 6.

Оцінка ефекту. Середня маса пухлини на 13-й день після трансплантації – 4,3 г (3,5–7,4). Середня величина терміну життя – 24 дні. Мінімальний критерій активності – гальмування росту пухлини > 50% або збільшення терміну життя на > 25%. День кінцевої оцінки – 60–90.

### **Лімфоцитарний лейкоз P388**

Походження. У 1955 році індукований у мишей лінії DBA/2 шляхом змазування шкіри метилхолантреном.

Загальні відомості. Прищеплюється введенням асцитної рідини в черевну порожнину мишам DBA/2 або гібридам BDF<sub>1</sub>, або CDF<sub>1</sub>. Лікування починають через 24 години після прищеплення. Параметром ефекту є ЗТЖ.

Прищеплення штаму. Тварини – миші DBA/2, гібриди BDF<sub>1</sub>, або CDF<sub>1</sub>.

Прищеплення – введення в черевну порожнину.

Місце прищеплення – введення в черевну порожнину 0,25 мл/мишу асцитної рідини при розведенні розчином Хенкса 1:40.

Час прищеплення на штаму 6–8 день.

Прищеплення для випробувань – миші DBA/2 або гібриди BDF<sub>1</sub>, або CDF<sub>1</sub>. Кожна тварина отримує 0,3 мл розведеного цитратом та середовищем 199 асцити, в якому міститься  $10^5$ – $10^6$  клітин.

Кількість тварин в дослідній групі не менше 6.

Кількість тварин в контрольній групі – 6–10.

Оцінка ефекту. Середня тривалість життя контрольних тварин – 8–11 днів.

Параметр ефекту. Збільшення тривалості життя в процентах до контролю або виживання тварин на 30 день оцінки ефекту.

Мінімальний критерій активності > 25%.

День кінцевої оцінки – 30–90 день.

### Гемоцитобластоз La

Походження. Лейкоз La індукований у миші C57B1 шляхом одноразового рентгенівського опромінення у 1955 році.

Загальні відомості. Прищеплюється суспензією клітин селезінки з визначеною кількістю лейкозних клітин. Лікування починається через 24 години після прищеплення. Параметром ефекту є ЗТЖ дослідних тварин щодо контрольних тварин.

Час прищеплення – 6–7 день.

Випробування препаратів.

Тварини – миші C57B1.

Кількість тварин в дослідній групі – 6–10.

Спосіб введення препаратів – в черевну порожнину.

Оцінка ефекту. Середня тривалість життя контрольних тварин – 6–9 днів залежно від кількості прищеплюваного матеріалу.

Параметри ефекту. Збільшення тривалості життя в процентах до контролю або кількість тварин, що вижили на 30 день після прищеплення. Мінімальний критерій активності – збільшення тривалості життя на > 25%. Термін кінцевої оцінки – 30–90 день.

### Меланома B 16

Походження. Пухлина виникла спонтанно в 1954 р. у шкірі миші C57B1 біля ока.

Загальні відомості. Меланома B 16 прищеплюється під шкіру суспензією пухлинної тканини мишам C57B1. Лікування починають через 48 годин після прищеплення. Параметром ефекту є маса, об'єм пухлини, а також тривалість життя.

Специфічні відомості. Кількість прищеплюваного пухлинного матеріалу – 50 мг в 0,5 мл фізіологічного розчину ( $2 \cdot 10^5$  клітин).

Час прищеплення – 16–20 день.

Випробування препаратів. Тварини – миші C57B1 або гібриди BOP1. Кількість тварин в дослідній групі 6–10.

Кількість тварин в контрольній групі 12–14.

Оцінка ефекту. Середня маса пухлини на 14 день після прищеплення – 3,8 г (2,6–6,0), середня тривалість життя – 30–40 днів.

Параметри ефекту. Процент гальмування росту пухлини за масою, об'ємом пухлини або процентом збільшення тривалості життя.

Мінімальний критерій активності – гальмування росту пухлини > 50%, збільшення тривалості життя > 25–50%.

Термін кінцевої оцінки – 90 день.

### Аденокарцинома молочної залози Ca 755

Походження. Ca 755 одержана у 1936 р. від спонтанної пухлини молочної залози у самиці миші C57B1.

Загальні відомості. Ca 755 прищеплюється під шкіру суспензією пухлинної тканини мишам лінії C57B1 чи гібридам BDF<sub>1</sub>. Лікування починають через 24–48 годин після прищеплення. Параметрами ефекту є маса пухлини, об'єм пухлини, а також величина терміну життя.

Специфічні відомості. Прищеплення штаму – миші лінії C57B1, самиці. Час прищеплення – 12–14 день.

Випробування препаратів. Стать тварин – тільки самиці.

Кількість тварин у дослідній групі – 6–10.

Кількість тварин у контрольній групі – 12–16.

Оцінка ефекту. Середня маса пухлини на 13 день прищеплення – 2,5 г (2,2–5,5), середня тривалість життя – 25,4 дні. Темп росту пухлини залежить від сезону. У весняно-літній сезон

## **Оцінка специфічної фармакологічної активності лікарських засобів**

тривалість життя – 22,7 днів при масі пухлини 12,6 г, в осінньо-зимовий період тривалість життя – 27,4 дні при середній масі пухлини 9,4 г.

Параметр ефекту. Процент гальмування росту пухлини за масою, об'ємом або збільшенням тривалості життя.

Мінімальний критерій активності – гальмування росту пухлини >50–70%, або збільшення тривалості життя > 25%. Термін кінцевої оцінки – 60–90 день.

### **Саркома 180**

Походження. Пухлина виникла спонтанно у білої миші-самця в 1914 р. у Крокеровському інституті (США). Спочатку була визначена як карцинома. У процесі прищеплення трансформувалася у малодиференційовану саркому.

Загальні відомості. Саркома 180 прищеплюється під шкіру 20% суспензією пухлинної тканини безпородним мишам. Лікування починають через 48 годин, або через 5–6 днів після прищеплення. Параметром ефекту є ГРП та ЗТЖ.

Специфічні відомості. Час прищеплення – 14–18 день.

Кількість прищеплюваного матеріалу – 50 мг пухлинного матеріалу в 0,2–0,3 мл фізіологічного розчину.

Кількість тварин у дослідній групі – 8–12.

Кількість тварин у контрольній групі – 15–20.

Оцінка ефекту. Середня маса пухлини на 13 день після трансплантації – 3 г (1,5–4,0). Середня тривалість життя – 35 днів (29,3–41,8).

Параметр ефекту. Процент гальмування росту пухлини за масою об'ємом або процентом збільшення тривалості життя.

Мінімальний критерій активності – гальмування росту пухлини > 50% або збільшення тривалості життя > 25%. Термін кінцевої оцінки – 90 день.

### **Карциносаркома Уокера 256**

Походження. Пухлина виникла в 1928 році як спонтанна аденокарцинома молочної залози вагітної безпородної самиці щура.

Загальні відомості. Пухлина прищеплюється під шкіру безпородним щурам. Лікування починають через 24 години або 3–6 днів після прищеплення.

Параметрами ефекту є гальмування росту пухлини за масою або об'ємом, а також збільшення тривалості життя.

Час прищеплення – 7–14 день.

Кількість прищеплюваного пухлинного матеріалу – 50 мг в 0,3–0,4 мл фізіологічного розчину.

Випробування препаратів.

Тварини – безпородні щури.

Кількість тварин у дослідній групі – 8–12.

Кількість тварин у контрольній групі – 15.

Оцінка ефекту.

Середня маса пухлин у контрольних тварин на 14 день після прищеплення – 33 г. Середня тривалість життя – 15–25 днів.

Параметри ефекту: ГРП та ЗТЖ.

Мінімальний критерій активності – процент гальмування росту пухлини > 50.

### **Лімфосаркома Пліса**

Походження. Пухлина одержана в 1958 р. у НДІ онкології Г.Б. Плісом після підшкірного прищеплення пухлини, що виникла у щурів після введення 3,3-дихлорбензолу. Пухлина прищеплюється на білих безпородних щурах з 1958 р. Ця система використовується як модель, для якої параметром ефекту є маса пухлини.



Специфічні відомості. Пухлина прищеплюється під шкіру 0,4 мл 30% суспензії пухлинної тканини у фізіологічному розчині. Матеріал для прищеплення береться на 14–16 день після трансплантації.

Випробування препарату.

Місце трансплантації: під шкіру боку по 0,4 мл 30% суспензії пухлинної тканини у фізіологічному розчині, взятої на 14–16 день після трансплантації.

Тварини: білі безпородні щури, самці, або самиці з масою тіла 100–120 г, віком 8–10 тижнів. Кількість тварин у дослідній групі – 10, в контрольній – 12–15.

Режим випробувань. Внутрішньоочеревинні ін'єкції речовини, починаючи з 4–5 дня після трансплантації, всього 10–12 ін'єкцій.

Оцінка результатів.

На наступний день після закінчення лікування за масою пухлини.

Оцінка ефекту: ГРП та ЗТЖ.

Критерій активності – відсоток гальмування росту пухлин > 40–50.

### Саркома 45

Походження. Веретенноклітинна саркома виникла в 1949 р. після введення диметилбензантрацену в підшкірну клітковину безпородних щурів.

Загальні відомості. Пухлина прищеплюється під шкіру 20% суспензією пухлинних клітин безпородним щурам. Лікування починають на 4–5 добу після трансплантації. Параметром ефекту є гальмування росту пухлини.

Час прищеплення – 14–20 день.

Кількість прищеплюваного пухлинного матеріалу: 100 мг пухлинного матеріалу в 0,3–0,4 мл фізіологічного розчину.

Кількість тварин в дослідній групі – 8–10.

Кількість тварин в контрольній групі – 15.

Оцінка ефекту. Середня маса пухлини на 16 день 19,3 г, середня тривалість життя – 18–25 днів.

Параметр ефекту – гальмування росту пухлини за масою.

Мінімальний критерій активності – відсоток гальмування росту пухлини >50–70.

### Карцинома Герена

Походження. Карцинома одержана в 1934 р. прищепленням спонтанної аденокарциноми матки миші щуру популяції Вістар.

Загальні відомості.

Пухлина прищеплюється суспензією під шкіру безпородним щурам. Лікування починають на 3–7 день після трансплантації пухлини. Параметром ефекту є гальмування росту пухлини.

Час прищеплення – 13–17 день.

Випробування препаратів.

Тварини – безпородні щури.

Стать тварин – лише самиці.

Кількість тварин в дослідній групі – 10

Кількість тварин в контрольній групі – 15

Середня маса пухлини – 20–25 г.

Мінімальний критерій активності: ГРП – 70%.

**Література**

1. Пейсахович И.М. и др. Химиотерапия злокачественных опухолей.– К.: Госмедиздат УССР, 1961.– 304 с.
2. Ларионов Л.Ф. Химиотерапия злокачественных опухолей.– М.: Мед. лит., 1962.– 464 с.
3. Софьина З.П. Первичный отбор противоопухолевых препаратов: Методические рекомендации.– М., 1980.– 31 с.
4. Экспериментальная оценка противоопухолевых веществ в СССР и США/Под. ред. З.П.Софьиной и др.– М.: Медицина, 1980.– 295 с.
5. Методические рекомендации по доклиническому изучению средств, обладающих способностью ингибировать процесс метастазирования и повышать эффективность цитостатической терапии злокачественных опухолей.– М.: ФК МЗ РФ, 1992.
6. Методические указания по изучению противоопухолевой активности фармакологических веществ.– М.: ФК МЗ РФ, 2000.

## ВИВЧЕННЯ АНТИВІРУСНОЇ ДІЇ ПОТЕНЦІЙНИХ ЛІКАРСЬКИХ ЗАСОБІВ

Щербінська А.М.,  
Дяченко Н.С.,  
Рибалко С.Л.,  
Носач Л.М.,  
Дядюн С.Т.,  
Вринчану Н.О.

### Перелік скорочень

- АІ** – антивірусний індекс  
**АП** – антивірусні препарати  
**БУО** – бляшкоутворююча одиниця (кількість вірусу, що викликає утворення 1 бляшки в культурі клітин)  
**ВВС** – вірус везикулярного стоматиту  
**ВГЗ** – вірус герпесу звичайного  
**ВІЛ** – вірус імунодефіциту людини  
**ГРЗ** – гострі респіраторні захворювання  
**ЕД<sub>50</sub>** – ефективна доза АП, що на 50% знижує число бляшок, розвиток ЦПЕ чи забезпечує виживання половини тварин  
**ЕІД<sub>50</sub>** – ембріональна інфекційна доза, що у 50% КЕ викликає розвиток інфекції  
**ІЕ** – індекс ефективності, що визначається на КЕ та тваринах  
**ІД<sub>50</sub>** – інгібуюча доза АП, що зменшує кількість життєздатних клітин на 50%  
**ІДмін** – індукуюча інтерферон доза мінімальна  
**ІС** – індекс селективності  
**ІФА** – імуноферментний аналіз  
**КВ** – контроль вірусу  
**КЕ** – курячі ембріони  
**КЗ** – коефіцієнт захисту або кратність захисту  
**ЛД<sub>50</sub>** – летальна доза вірусу чи токсична доза АП, що спричиняє ефект у 50% тварин  
**МАК** – мінімально активна концентрація АП  
**МІК** – мінімальна інгібуюча концентрація АП, що знижує на 50% число клітин з включеннями чи антигеном  
**МПК** – максимально переносима концентрація АП, що не проявляє цитотоксичної дії в культурі клітин  
**МО** – міжнародні одиниці  
**МТД** – максимально толерантна доза (те ж саме, що МПК)  
**МТТ** – 3-(4-5-диметилтріазол-2-іл)-2, 5-дифенілтетразоліум бромід  
**МФА** – метод флюоресціюючих антитіл  
**ПАІ** – показник активності інтерферону

**СЕМ** – культура лімфобластоїдних клітин

**CD<sub>50</sub>** – цитотоксична доза, що зменшує ріст клітин на 50% або пригнічує синтез ДНК на 50%

**СТЖ** – середня тривалість життя тварин

**СЗ** – стандартний зразок

**ТІ** – терапевтичний індекс

**ТХО** – трихлороцтова кислота

**ТЦД<sub>50</sub>** – тканинна цитопатогенна доза вірусу, що спричиняє ураження 50% моношару клітин

**ХТІ** – хіміотерапевтичний індекс

**ЦМВ** – цитомегаловірус

**ЦПД** – цитопатогенна дія

**ЦПЕ** – цитопатогенний ефект у культурі тканин

**ШМТЕЛ** – культура шкірно-м'язової тканини ембріона людини

### Вступ

Віруси займають одне з чільних місць в патології людини, спричинюючи до 80% інфекційних хвороб, які можуть розвиватись як гострі захворювання з епідемічним поширенням, а також у формі хронічних і так званих повільних інфекцій. Унікальність вірусів обумовлена їхньою убиквітарністю, патогенністю, своєрідністю складу та організації, зокрема відсутністю власної клітинної будови і тісним зв'язком з метаболізмом інфікованої клітини в процесі репродукції вірусу.

Роль вірусів у патології людини неспинно зростає, бо продовжується відкриття нових вірусів, накопичуються докази участі вірусів у хворобах, які раніше етіологічно та патогенетично не пов'язувалися з ними – інфаркт міокарда, виразка шлунка, розсіяний склероз та деякі інші [8].

Різноманітний спектр дії вірусів на організм людини, широке розповсюдження вірусних інфекцій, важкий перебіг та тяжкі ускладнення обумовлюють актуальність розробки засобів боротьби. Ефективним засобом є застосування вакцин, проте тільки за певних умов. Це, перш за все, розвиток набутого напруженого імунітету, часто довічного, перебіг захворювання переважно в гострій формі, маловиражена мінливість збудника та малочисельність родини-представника. Перелік таких інфекцій невеликий, це так звані контрольовані інфекції, переважно дитячі (поліомієліт, кір, паротит та деякі інші).

Для більшості вірусних інфекцій з тих чи інших причин вірусні вакцини неефективні або не розроблені, чимале значення в цьому має здатність того чи іншого вірусу спричинити не тільки гостре захворювання, а й його спроможність персистувати в організмі людини тривалий час. Єдиним засобом боротьби з такими вірусними інфекціями має стати хіміотерапія, тобто лікувальне і, по можливості, профілактичне застосування речовин хімічного чи природного походження, здатних вибірково пригнічувати репродукцію вірусів у клітині і макроорганізмі.

Експериментальна хіміотерапія як галузь вірусології почала інтенсивно розвиватися в останні 20–30 років. Цей напрям досить інтенсивно розвивався і у колишньому Радянському Союзі, коли, зокрема, сформувалися наукові центри в Мінському інституті епідеміології та мікробіології, Інституті мікробіології АН Латвійської РСР у Ризі, Інституті вірусології ім. Д. Й. Івановського АМН Росії. Цими колективами регулярно видавалися спеціалізовані наукові збірники, проводились щорічні наукові конференції. В Україні відповідні наукові осередки сформовані в Київському інституті епідеміології і інфекційних хвороб МОЗ України, Інституті мікробіології і вірусології НАН України, Одеському інституті вірусології та епідеміології МОЗ України.

На сьогодні відомо і впроваджено в лікарську практику кілька антивірусних препаратів (АП), які належать до певних груп хімічних речовин. Найчастіше це аномальні нуклеозиди, які завдяки хімічній подібності до вірусних нуклеїнових кислот вибірково порушують їх синтез в інфікованій клітині. Це азидотимідин, що інгібує зворотню транскрипцію при репродукції ВІЛ, віразол [6], прикладом антивірусного препарату з чітким вибірковою механізмом дії є ацикловір (зовіракс), подібний до нього за структурою ганцикловір та фамцикловір, які переважно інгібують синтез ДНК-полімерази вірусів герпесу звичайного, цитомегаловірусу та вірусу варіцели-герпес зостер [16, 17, 27]. Застосовуються ненуклеозидні інгібітори зворотної транскриптази ВІЛ. Іншу групу становлять інгібітори протеолізу, які інтенсивно розробляються відносно ВІЛ (криксиван) та інших вірусів. Широковідомий мерборан – ефективний інгібітор вірусу віспи, який став допоміжним засобом, окрім вакцини, в реалізації програми глобальної ліквідації віспи [6].

Впроваджені також кілька препаратів з віруліцидним механізмом дії, тобто здатністю впливати на позаклітинний вірус. Це оксолін, флореналь, які ефективні проти деяких ДНК-вмісних вірусів. Більш повно перелік АП, що застосовуються у лікувальній практиці, наведено в табл. 1. Для більшості препаратів у ній вказана стадія репродукції певного вірусу, чутлива до дії АП, тобто його мішень.

Особливу групу інгібіторів вірусів, що виробляються клітиною у відповідь на її інфікування і діють як механізм захисту, становлять інтерферони. До дії інтерферону чутлива більшість вірусів, патогенних для людини, і вони досить часто застосовуються. Особливу увагу приділяють інтерфероногенам, тобто речовинам, які здатні індукувати в організмі синтез ендогенного інтерферону. Вони можуть бути синтетичні або мати природне походження [6, 10]. Перелік відомих препаратів, інтерферонів та інтерфероногенів, що застосовуються в клініці вірусних інфекцій, наведений в табл. 2.

Фармацевтичний ринок України щодо антивірусних препаратів ненасичений і представлений в основному ацикловіром під різними торговими назвами, ремантадином, бонафтоном, азидотимідином та кількома лікарськими формами натурального чи рекомбінантного інтерферону, його індукторами (табл. 1, 2).

Виходячи з наведеного вище, пошук (скринінг) антивірусних препаратів і їх впровадження в лікарську практику є актуальним завданням світової та вітчизняної вірусології.

Зрозуміло, що створення єдиного універсального противірусного препарату неможливе, бо віруси, що представляють різні родини, суттєво різняться за такими фундаментальними властивостями, як організація генома, механізми його експресії в клітині. Саме ці процеси часто є мішенями для дії АП. Подальший пошук і дослідження АП тісно пов'язані з розвитком молекулярної вірусології, хімії, зокрема хімії нуклеїнових кислот, фармакології.

Необхідно вказати на обставину, яка знижує ефективність застосування антивірусних препаратів і повинна братись до уваги. Це, перш за все, утворення варіантів того чи іншого вірусу, резистентних до дії АП, що відбувається в організмі хворого і експериментальних умовах завдяки вираженій його мінливості, і спонукає до пошуку все нових АП. Альтернативний шлях – комбіноване застосування АП з різним механізмом дії, що дає змогу, крім того, зменшити дозу кожного з препаратів. Цей прийом зараз інтенсивно розвивається, зокрема стосовно хіміотерапії ВІЛ-інфекції.

Подальший пошук АП ускладнюється відсутністю уніфікованих схем і методів скринінгу, що значно гальмує вирішення проблеми створення ефективних антивірусних хіміотерапевтичних препаратів і обґрунтовує необхідність розробки даних методичних рекомендацій. Вони містять виклад принципів і сучасних методів відбору та аналізу АП, часто із залученням власного досвіду авторів.

Оскільки в сучасній літературі з експериментальної хіміотерапії має місце певна розбіжність щодо застосованих показників і критеріїв оцінки активності нових АП на стадії їх відбору, це питання детально розглядатиметься і будуть надані певні рекомендації.

## Класифікація антивірусних препаратів

Хімічна група речовин і назва препарату	Чутливий вірус	Точка прикладання антивірусної дії
<b>I. Антивірусні речовини, що інгібують репродукцію вірусу</b>		
<i>1. Аномальні нуклеозиди:</i>		
Азидотимідин (зидовудин, ретровір, тимозин) Диданозин Залцитабін Ламівудин Ацикловір (зовіракс, віролекс, герпевір) Ганцикловір (цимовене) Відарабін	ВІЛ  —«— —«— —«— ВГЗ-1, ВГЗ-2, варіцела-зостер, ВЕБ ЦМВ, ВЕБ, ВГ типу 6 ВГЗ-1, ВГЗ-2, варіцела-зостер, ВЕБ, ЦМВ, вірус вакцини ВГЗ-1, вірус вакцини	Інгібують зворотну транскриптазу  —«— —«— —«— Фосфорилується вірусною тимідинкіназою і інгібує вірусну ДНК-полімеразу —«— Інгібує вірусспецифічну ДНК-полімеразу
Ідоксуридин (ІДУ, керезид, ідуридин, герплекс, дендрид, офтан-ІДУ) Трифлюридин	ВГЗ-1, ВГЗ-2, ЦМВ, деякі типи аденовірусів	Включається у вірусну ДНК та інгібує утворення зрілих віріонів, викликає формування дефектних вірусних часток Інгібує вірусну ДНК-полімеразу
Рибавірин (віразол, рибамідил)	Віруси грипу А і В, парагрипу, адено- і бун'явіруси, РС-вірус, віруси гепатиту	Включається в кап-структуру мРНК й інгібує синтез вірусних білків; інгібує синтез вірусспецифічних РНК-полімераз та інозинмонофосфодегідрогенази
<i>2. Похідні адамантану:</i>		
амантадин  ремантадин адапромін дейтифорин тромагантин	Вірус грипу А  Вірус грипу А Вірус грипу А і В Вірус грипу А, парагрипу типу 3, РС-вірус ВГЗ-1, ВГЗ-2	На ранні стадії репродукції вірусу, мішень дії не визначена  —«— —«— —«— —«—
<i>3. Похідні тіосемікарбазонів:</i>		
марборан (метисазон)	Вірус віспи	Інгібує синтез структурних вірусних білків
<i>4. Синтетичні амінокислоти:</i>		
ε-амінокапронова кислота  амбен	Вірус грипу А і В, парагрипу, РС-вірус, аденовірус Вірус грипу А і В, деякі віруси, що спричиняють ГРЗ	Інгібітор протеолізу  —«—
<i>5. Аналоги пірофосфату:</i>		
фоскарнет (фосфоноформова кислота, ФФК)	ВГЗ-1, ВГ типу 6, вірус гепатиту В, ВІЛ, ЦМВ	Інгібує вірусспецифічні ферменти
<i>6. Інші речовини:</i>		
криксиван пандовір (поліетерин, азіаламіцин, гелексин) хельпін арбідол бонафтон	ВІЛ ВГЗ-1, ВГЗ-2  Варіцела-зостер, ВГЗ-1 Віруси герпесу, грипу А і В Віруси герпесу, деякі аденовіруси	Інгібітор протеолізу Інгібує синтез вірусної ДНК і структурних білків  —«— Інгібує вірусну ДНК-полімеразу —«—
<b>II. Віруліцидні речовини:</b>		
оксолін  теброфен флореналь	Віруси герпесу, міксо- і риновіруси Віруси герпесу, аденовіруси Віруси герпесу, аденовіруси	Інактивує позаклітинний вірус  —«— —«—

Примітки: ВІЛ – вірус імунодефіциту людини, ВГ типу 6 – вірус герпесу типу 6, ВГЗ-1, ВГЗ-2 – вірус герпесу звичайного типу 1 або 2, ВЕБ – вірус Епштейна-Барр, ЦМВ – цитомегаловірус, РС-вірус – респіраторно-синцитіальний вірус, ГРЗ – гострі респіраторні захворювання.

Індуктори інтерферону, придатні для клінічного застосування [5]

Хімічна природа	Назва препаратів
Синтетичні сполуки 1. Низькомолекулярні – флуорени – азотні основи 2. Полімери – полі А:У – полі Г:Ц	Аміксин Камедон  Полудан Полігуацил
Природні сполуки 1. Низькомолекулярні (поліфеноли – похідні госиполу) 2. Полімери (двоспиральні РНК)	Мегасин, кагоцел, саврац, рагосин, гозалідон Ларифан, ридостин
Офіційні препарати: 1. Метилксантини 2. Похідні ізахіноліну 3. Похідні імідазолу 4. Похідні бензофурану 5. Похідні хромену	Теофілін, теобромін, еуфілін, дипіридамомл, кофеїн Папаверин, но-шпа Дибазол Кордарон Інтеркордин

### 1. Основні принципи пошуку (скринінгу) потенційних лікарських засобів з антивірусною активністю

Під антивірусними препаратами (АП) розуміють речовини хімічного або природного походження, які здатні пригнічувати репродукцію вірусу в клітині та біологічній системі хазяїна – організмі людини [2, 6, 10]. До АП також відносяться речовини з віруліцидною дією, які впливають на позаклітинний вірус. Необхідною умовою, якій повинні відповідати потенційні антивірусні речовини, є високий ступінь розчинності у воді та нетоксичних розчинниках, що забезпечує проникнення АП у клітини і його дієвість.

Пошук АП повинен проходити за певною технологією і включати кілька стадій [3, 4].

А. Експериментальне вивчення.

1. Первинний відбір – виявлення ефекту пригнічення репродукції вірусу в дослідах *in vitro* (в культурі клітин) чи *in ovo*.

2. Дослідження антивірусної дії хімічної сполуки – досліди *in vivo*, для чого на тваринах експериментально відтворюється захворювання, спричинене вірусами, патогенними для людини.

3. Токсико-фармакологічне вивчення відповідно до вимог Державного фармакологічного центру МОЗ України.

Б. Клінічне вивчення препарату у вигляді лікарської форми.

1. I фаза клінічних досліджень – вивчення нетоксичності, сприйнятності, biodostupnosti.

2. II фаза клінічних досліджень – визначення специфічної активності АП та відпрацювання лікувальної схеми.

Предметом нашого аналізу будуть тільки два перші етапи експериментального вивчення, які охоплюють проведення власне вірусологічних досліджень.

Слід відзначити, що для речовин, антивірусна дія яких на рівні макроорганізму здійснюється із залученням системи інтерферону, дослідження *in vitro* часто неефективні. Тому речовини з потенційною інтерфероніндукуючою активністю можуть одразу досліджуватись *in vivo* [6, 10].

У виняткових випадках дослідження *in vivo* можуть не проводитись і антивірусний препарат може бути переданий безпосередньо в клініку для випробування, звичайно після вивчення його токсичних властивостей. Це стосується тяжких, що загрожують життю, захворювань, для яких відсутні відповідні експериментальні моделі. Протягом багатьох років таким винятком була ВІЛ-інфекція та СНІД, але зараз рекомендується для цього використовувати лейкоз

## Оцінка специфічної фармакологічної активності лікарських засобів

мишей, спричинений вірусом лейкозу Раушера, та, за рекомендаціями фірми «Viomed», ВІЛ-інфекцію мишей «nude», підданих рентгенівському опроміненню, яким трансплантували інфіковані ВІЛ лімфобластоїдні клітини СЕМ.

Вірусні моделі, які найчастіше використовують для дослідження АП, обумовлені значимістю певних вірусів в патології людини. Це ВІЛ, віруси грипу А і В, вірус герпесу звичайного 1 та 2 типів (ВГЗ-1 та ВГЗ-2), цитомегаловірус (ЦМВ), віруси гепатитів, аденовіруси, тогавіруси. У табл. 3 наведені деякі з вірусних моделей, що застосовуються для пошуку і дослідження нових АП. Більш повно це питання висвітлене Н.П.Чижовим та ін. [10].

Таблиця 3

### Деякі моделі, що застосовуються для пошуку антивірусних препаратів

Тип вірусу	Назва вірусів	Моделі in vitro		Моделі in vivo	
		культури клітин	тестування	тварини	тестування
РНК-вмісні віруси	Грипу А та В Риновірус парагрипу Поліовірус РС вірус	МДСК, Vero, RMK, MRC-5, MT-4, L-41, L, Нер-2, СЕМ-CCRF HeLa T4+ фібробласти людини, курячого ембріону, мишей, шурів та ін. HeLa T4+, MT-4, СЕМ-SS, СЕМ-CCRF H 9, РВМС, COS	ЦПД, УБ, ІФА, ГА, ЛПР, ВІВ, МФА	миші	загибель, пневмонія
	ВІЛ	HeLa T4+, MT-4, СЕМ-SS, СЕМ-CCRF H 9, РВМС, COS	ІФА, УБ, ЛПР, АЗТ	"nude" миші, яким трансплантовані ВІЛ-інфіковані клітини СЕМ, миші з лейкозом Раушера	ІФА, ЛПР, УБ, АЗТ
ДНК-вмісні віруси	Герпесу звичайного типу 1 типу 2	RK-13, L, HeLa, Vero, MRC-5, фібробласти людини, миші, курячих ембріонів	ЦПД, ІФА, ЛПР, МФА, УБ, ВІВ,	миші, морські свинки, шури, кролі	Герпетичний енцефаліт, оро-фаціальний герпес, генітальний герпес, кератит, пневмонії
	Аденовіруси	KB, HeLa, Нер-2, А-549	УБ, УВ, ІФА, МФА, ВІВ	хлопкові шурята, новозеландські кролі	ураження очей

Примітка: АЗТ – активність зворотної транскриптази ВІЛ, ВІВ – врожай інфекційного вірусу, ІФА – імуноферментний аналіз, ЛПРА – ланцюгова полімеразна реакція, МФА – метод флюоресціюючих антитіл, УБ – утворення бляшок, УВ – утворення включень.

Вимоги до лабораторій, що проводять вірусологічні дослідження з метою пошуку антивірусних препаратів, в основному такі.

1. Лабораторія повинна мати дозвіл МОЗ України на проведення скринінгових випробувань речовин з потенційною антивірусною активністю.
2. Лабораторія повинна бути оснащена сучасним обладнанням, забезпечена банком культур клітин, мати колекцію еталонних та свіжовиділених штампів вірусів.
3. Дослідження АП проводять фахівці-вірусологи, що мають кількарічний досвід роботи у цій галузі за технологією, визначеною даними методичними рекомендаціями.

## 2. Дослідження антивірусної дії потенційних лікарських засобів у культурі клітин

Первинний скринінг речовин на антивірусну активність проводять у культурі клітин; отримані результати є підставою для висновку про перспективність та доцільність подальшого про-



ведення випробування *in vivo*. Використовуються специфічні, кількісні, швидкі та відносно прості у виконанні методи аналізу репродукції того чи іншого вірусу, які повинні забезпечити масштабний та економічно виправданий відбір потенційно активних антивірусних препаратів.

Система дослідження антивірусної дії АП *in vitro* складається з двох етапів.

1. Визначення здатності потенційного лікарського засобу пригнічувати репродукцію вірусів при застосуванні методів, що виявляють вірусіндуковані зміни моношару чи окремої клітини (пригнічення цитопатогенної дії – ЦПД), формування бляшок, інфекційних центрів, накопичення вірусних антигенів чи вірусспецифічних ферментів. На цьому етапі оцінюють цитотоксичність АП.

2. Кількісна оцінка дії речовин на врожай інфекційного вірусу, причому інфекційність розглядається як інтегральний показник функціональної цілісності вірусу.

Дослідження препарату починається з порівняльної оцінки його цитотоксичності (незворотного впливу на морфологію та метаболізм клітин) та антивірусної дії. Перспективними можуть бути речовини, які проявляють виражену антивірусну активність у концентраціях, вже нетоксичних для клітин, тобто експериментально визначається суттєва різниця між дозами препарату з цитотоксичною та антивірусною дією.

Принцип порівняння специфічної антивірусної дії та токсичності реалізується у подальшому на етапі вивчення потенційної антивірусної речовини *in vivo*. Тільки невелика кількість речовин, що були відібрані на етапі *in vitro*, зберігає виражену активність *in vivo*. Однією з причин цього є неправильне визначення цитотоксичності речовин у культурі клітин. Таке може мати місце, якщо не досліджується прихована токсичність речовини, тобто вплив її на ріст, поділ та метаболізм клітин. Неврахування цього може призвести до заниження величини токсичності і помилкового визначення показників, що характеризують співвідношення між концентраціями з токсичною та антивірусною дією.

### **2.1. Визначення цитотоксичної дії потенційних антивірусних засобів у культурі клітин**

Дослідження передбачає визначення максимально переносимої концентрації речовини, тобто такої, що не спричиняє незворотних змін у морфології та життєздатності клітин. Показники цитотоксичності мають різні позначення, прийняті у сучасній експериментальній хіміотерапії: МПК (максимально переносима концентрація, що не виявляє цитотоксичної дії) чи МТД (maximum tolerated dose);  $ID_{50}$  (інгібуюча доза, що зменшує кількість життєздатних клітин на 50%),  $CD_{50}$  (cytotoxic dose – цитотоксична доза, що зменшує ріст клітин або синтез ДНК на 50%). Вони необхідні для визначення показників, що характеризують вибірковість антивірусної дії, які однакові за суттю, але позначаються по-різному. Це ХТІ (хіміотерапевтичний індекс) чи ТІ (терапевтичний індекс), АІ (антивірусний індекс) або ІС (індекс селективності). Вони є основними критеріями оцінки ефективності речовин у культурі клітин при первинному відборі і доцільності подальших випробувань *in vivo* [2, 4, 11, 15, 22].

До цього часу не існує уніфікованого методу оцінки цитотоксичності речовин у культурі клітин. Використовують один або кілька з нижченаведених методів, які доповнюють один одного.

#### **2.1.1. Виявлення цитотоксичності препарату за дією на моношар клітин**

Перещеплювану чи первинну культуру клітин вирощують у пробірках, 24- або 96-лункових мікроплатах (у цьому випадку культивування ведеться у термостаті в атмосфері, що містить 5%  $CO_2$ ). Через 24–48 год при сформуванні моношару клітин проводять заміну поживного середовища на таке, що містить досліджувану речовину в різних концентраціях. Використовують такі концентрації: 1000, 500, 250 або 1600, 800, 400 мкг/мл і так далі. Досліджують спочатку 6–8 концентрацій, часто через 1–2 розведення, а потім детальніше. На кожну концен-

трацію використовують 3–4 пробірки або лунки з клітинами. У контролях проводять заміну поживного середовища на середовище без речовини.

Через 24, 48 та 72 год клітини досліджують у світловому мікроскопі (у випадку мікроплат – в інвертованому) при малому збільшенні на наявність цитотоксичної дії речовини, яку оцінюють за порушенням цілісності моношару, появою вогнищ дегенерованих клітин. Ступінь токсичності визначають через 72 год за 4-хрестовою системою і знаходять МПК або інколи 1/2 МПК речовини – тобто половинну концентрацію сполуки, яка не проявляє токсичної дії щодо клітин за даними прижиттєвого цитологічного дослідження [4, 10].

### *2.1.2. Визначення цитотоксичної дії АП за пригніченням життєздатності клітин*

Моношар культури клітин обробляють антивірусною речовиною в різних концентраціях протягом 3–4 днів. Підрахунок життєздатності клітин проводять щодня, використовуючи трипановий синій або нейтральний червоний; через три дні визначають відсоток зменшення життєздатних клітин і концентрацію препарату, яка зменшує його на 50% ( $CD_{50}$ ) порівняно з контролем.

### *2.1.3. Визначення цитотоксичності АП за впливом на життєздатність клітин*

Деякі дослідники вважають, що більш об'єктивним є визначення цитотоксичності речовини за пригніченням мітотичної активності культури клітин. Антивірусний препарат додається до добової культури, що перебуває в стані інтенсивного поділу клітин. Обробка продовжується ще протягом 3–4 днів. Щодня визначають кількість життєздатних клітин у культурі, а через 3 дні обробки – концентрацію, в якій препарат пригнічує ступінь росту клітин на 50% ( $CD_{50}$ ) щодо контролю.

Для визначення кількості життєздатних клітин моношар клітин обробляють трипсином або версеном, фарбують трипановим синім або нейтральним червоним і досліджують у камері Горяєва або за допомогою інших лічильних камер, які застосовуються у гематології.

Зрідка токсичність речовин визначається за кількістю фарби, яку поглинають живі клітини. Клітини фарбують нейтральним червоним, фарбу екстрагують етиловим спиртом і на спектрофотометрі визначають оптичну густина при 546 нм. Вважається, що кількість адсорбованого барвника пропорційна кількості живих клітин [2, 6, 26].

Життєздатність клітин можна визначати і при використанні 3-(4-5-диметилтріазол-2-іл)-2,5-дифенілтетразоліум броміду (МТТ) [19]. Клітини вирощують у мікроплатах. Через 76 год живильне середовище видаляють і моношар клітин покривають МТТ (5 мг/мл), розчиненим у забуференому фізіологічному розчині, інкубують при 37°C протягом 4 год (до появи блакитного кольору). Після цього розчин з МТТ видаляють і в кожен лунку вносять підкислений ізопропанол (100 мкл 0,04 N HCl в ізопропанолі). Оптичну густина визначають при 570 нм. Концентрація речовини, яка зменшує оптичну густина на 50% відносно необробленого моношару клітин (контролю), приймається за  $CD_{50}$  [13].

Рекомендується застосування регресійного аналізу для кількісної характеристики цитотоксичної дії речовини на ростову здатність культури клітин. Для цього експериментально досліджується вплив 3–4 концентрацій речовини на число живих клітин відповідно до описаних раніше методичних прийомів, а потім обчислюється коефіцієнт регресії та рівняння регресії, на їх підставі графічно зображується лінія регресії в напівлогарифмічній системі координат, причому по вертикалі відкладається кількість живих клітин щодо контролю у відсотках, а по горизонталі – зростаючі концентрації речовини [1]. Користуючись лінією регресії, легко точно визначити 50% цитотоксичну концентрацію речовини. Слід відзначити, що експериментально для цього можна дослідити тільки 3–4 концентрації речовини [24].

Застосування регресійного аналізу особливо інформативне у разі вивчення впливу модифікацій структури сполук певного класу на їх цитотоксичність.

#### *2.1.4. Визначення цитотоксичності АП за здатністю пригнічувати синтез клітинної ДНК*

Деякі препарати проявляють так звану приховану цитотоксичність, виявлення якої неможливе при мікроскопії живих чи фіксованих клітин, оскільки це явище полягає у пригніченні синтезу ДНК клітин під впливом АП.

Найчастіше клітини вирощують у стерильних сцинтиляційних флаконах, через добу замінюють поживне середовище на середовище з різними концентраціями антивірусної речовини з додаванням [метил-<sup>3</sup>H] тимідину. На кожну концентрацію речовини використовують 4 флакони. Ще через добу середовище зливають, клітини промивають холодним фізіологічним розчином, обробляють 5% холодною трихлороцтовою кислотою протягом 30 хв при 4°C, 2–4 рази промивають цим розчином, потім 95% етиловим спиртом, ефіром, висушують, заливають сцинтилятором на толуоловій основі і визначають радіоактивність, використовуючи сцинтиляційні лічильники [12, 20], а потім величину  $CD_{50}$ .

Можна вирощувати клітини в чашках і в звичайних флаконах, але потім потрібно лізувати їх додецилсульфатом натрію, преципітувати ТХО і переносити осад на фільтри (Whatman GF/c) для подальшого визначення радіоактивності. Промиті й висушені фільтри вміщують у сцинтиляційні флакони, заливають сцинтилятором і визначають рівень радіоактивності [18].

Деякі дослідники використовують імпульсне мічення клітинної ДНК, коли [метил-<sup>3</sup>H] тимідин додається до середовища на 1 год через 24 год після обробки клітин речовинами [18].

За нашими даними, немає особливої різниці в оцінці цитотоксичності речовин при використанні довготривалого чи імпульсного мічення ДНК. Важливо підібрати в попередніх дослідах концентрацію міченого тимідину, оскільки вона залежить від способу мічення і активності тимідину.

Отже, при первинній оцінці цитотоксичної дії АП можна обмежитись визначенням впливу їх на ріст клітин або цитологічним дослідженням. Слід зазначити, що найменшу інформацію про цитотоксичність АП дає дослідження її впливу на стан моношару клітин при малому збільшенні світлового мікроскопа. При цьому визначаються тільки деструктивні зміни моношару, а морфологічні зміни клітин, які мають місце в цитоплазмі та ядрі, не можуть бути виявлені. Тому у разі застосування такого підходу необхідно додатково досліджувати культуру на наявність морфологічних змін клітин у люмінесцентному мікроскопі після флюорохромування їх акридиновим оранжевим. Проте остаточно цитотоксичність АП, перспективних для досліджень *in vivo* і подальших випробувань, слід визначати за пригніченням ними синтезу клітинної ДНК.

## **2.2. Дослідження антивірусної дії потенційних лікарських засобів у дослідах *in vitro***

Відповідно до рекомендацій світових центрів пошуку антивірусних препаратів, зокрема американської фірми «Viromed», на етапі визначення активності АП в культурі клітин доцільно використовувати як еталонні штами вірусів, адаптовані до культивування в лабораторних умовах, так і виділені безпосередньо від хворих штами, які пройшли тільки кілька пасажів. Доцільно використовувати найбільш універсальні та чутливі до певних вірусів культури клітин. Велике значення має вибір інфікуючої дози вірусу, вона залежить від застосованого методу обліку вірусної активності, але повинна забезпечити інфікування не менше 50% клітин у моношарі. Інфікуючу дозу чи множинність інфікування відпрацьовують у попередніх дослідах з використанням вірусу з визначеним титром інфекційності.

Вираженість антивірусної дії досліджуваних нових АП рекомендується порівнювати в одному досліді з дією вже відомих до цього вірусу стандартних АП з обов'язковою обробкою отриманих результатів методами варіаційної статистики. На цьому етапі застосовуються деякі нові показники, крім наведених у попередньому розділі показника ХТІ, його аналогів та показників цитотоксичності. Це показники ЕД<sub>50</sub> (50% ефективна доза) та МІК (мінімальна інгібуюча концентрація). Першою позначають концентрацію АП, в якій він знижує кількість бляшок чи розвиток ЦПЕ в інфікованій обробленій культурі клітин на 50%. Під МІК розуміють концентрацію АП, яка знижує на 50% число клітин з вірусспецифічними включеннями чи скупченнями вірусного антигену, тобто за суттю показники аналогічні. Рекомендується застосовувати ці показники і в тих випадках, коли вірусіндуковані зміни в культурі клітин реєструються іншими методами – за рівнем ферментів (зворотної транскриптази ВІЛ, ДНК-полімерази герпесвірусів), кількістю синтезованого вірусного білка (р24 ВІЛ), визначеного за допомогою ІФА. Після визначення показників цитотоксичності та антивірусної дії АП обчислюють ХТІ (або ТІ, АІ, ІС). Він обчислюється як відношення МПК (максимально переносимої концентрації АП, що не спричиняє цитотоксичних змін клітин) до МІК. Проте в літературі, особливо зарубіжній, в чисельнику вказаного відношення використовують показник ІД<sub>50</sub> чи СД<sub>50</sub>, тобто концентрації АП, які спричиняють цитотоксичні зміни в 50% клітин [15, 23]. Зрозуміло, що використання саме цього показника дещо завищує величину ХТІ і є, на нашу думку, помилковим.

Дослідження АП в культурі клітин повинні включати такі схеми введення АП: за добу та 4–1 год до зараження вірусом, під час адсорбції та після адсорбції вірусу на весь час його репродукції.

Попередніми роками на першому етапі визначення інгібуючої дії АП використовували так званий агар-дифузійний тест (метод дисків та циліндриків) як швидкий, демонстративний, економічний метод, заснований на дифузії в агарі АП, нанесеного на диск фільтрувального паперу або внесеного в циліндричні отвори в агаровому покритті.

Облік результатів проводився за величиною діаметра (в мм) зони інгібування вірусних бляшок у моношарі клітин, тобто метод давав можливість кількісно оцінювати дію АП [2, 4].

Відбір АП на підставі пригнічення вірусіндукованого ЦПЕ, хоч є швидким, простим, економічним, особливо при вирощуванні клітин у мікроплатах, і використовується деякими дослідниками, має суттєві недоліки. Слід нагадати, що під ЦПЕ (цитопатичний ефект) розуміють порушення цілісності моношару інфікованої культури клітин. За своєю суттю ЦПЕ не має рис, характерних для певного вірусу, і досить часто він пов'язаний не з власне синтезом інфекційного вірусу, а цитотоксичною дією на моношар клітин окремих компонентів віріона [7]. Крім того, цей тест не забезпечує одержання кількісних результатів. Виходячи з вищевказаного, його не варто застосовувати в дослідженні АП. Найчастіше для визначення інгібуючої дії АП використовують наведені нижче кількісні методи.

### 2.2.1. Метод редуції кількості бляшок

Простий і ефективний метод визначення антивірусної дії препарату щодо вірусів, які утворюють бляшки. Дослідження проводять у термостаті з 5% CO<sub>2</sub>. Клітини вирощують у чашках, флаконах, частіше – у 24-лункових платах. Поживне середовище складається з середовища 199 та Ігла у відношенні 1:1, 10% сироватки великої рогатої худоби. Моношар клітин інфікують постійною дозою вірусу з великою множинністю. Після адсорбції вірусу клітини промивають і в лунки вносять середовище з агаром або метилцелюлозою чи агарозою і різними концентраціями досліджуваної речовини. На кожну концентрацію використовують три лунки і чотири залишають для контролю (середовище без речовини), якщо дослід виконується на мікроплатах. Клітини продовжують інкубувати в термостаті, переглядаючи їх щодня в інвертованому мікроскопі для реєстрації появи бляшок (вогнищ дегенерації моношару). Час розвитку бляшок

залежить від вірусу і множинності інфікування, наприклад, бляшки вірусу герпесу (ВГЗ-1 і ВГЗ-2) формуються через 2 дні, аденовірусу – через 6 днів: Для підрахунку кількості бляшок в агар вводять нейтральний червоний або на кілька годин перед обліком додають інше покриття з барвником. Для обліку бляшок клітини можна також фіксувати 10%-им забуференим формаліном протягом 15 хв і фарбувати 1% кристал-віолетом у 20%-му етиловому спирті. Бляшки підраховують у світловому мікроскопі, можна для цього використовувати спеціальний лічильник Plaque Viewer. Порівнюють у відсотках кількість бляшок, утворених у присутності різних концентрацій речовин відносно контролю. Будують графічно дозозалежну криву, за допомогою якої визначають дозу, що зменшує кількість бляшок на 50% (ЕД<sub>50</sub>).

Відсоток редукції бляшок при дії АП може бути визначений за такими двома методами:

$$\% \text{ редукції бляшок} = 100 - \frac{Д \cdot 100}{К}, \text{ або}$$

$$= \frac{К - Д}{К} \cdot 100, \text{ де}$$

Д – число бляшок у досліді

К – число бляшок у контролі.

### 2.2.2. Метод зниження кількості клітин з вірусспецифічними включеннями під дією АП

Цей метод розроблено нами для оцінки інгібуючої дії АП у культурі клітин на моделі аденовірусів. Він може бути застосований і для оцінки дії АП на репродукцію інших вірусів, що утворюють включення, зокрема внутрішньоядерні ДНК-вмісні (наприклад, віруси з родини герпесвірусів, паповавірусів).

Суть цитоморфологічного методу полягає в тому, що інфіковані клітини, в яких репродукується вірус, визначають за утворенням у них ДНК-вмісних включень, що мають вірусну природу і являють собою місця накопичення структурних компонентів вірусу та сформованих віріонів [7]. Метод дозволяє виявляти власне репродукцію аденовірусів і визначати кількість клітин як показник репродукції вірусу. Навпаки, виявлення ЦПЕ в інфікованих культурах не дає можливості відіференціювати цитотоксичні зміни, які можуть бути викликані одним із структурних білків (пентоном) інфікуючого вірусу і проявляться у вигляді заокруглення, агрегації клітин та відокремлення їх від скла за відсутності синтезу вірусу і формування внутрішньоядерних ДНК-вмісних включень. Отже, метод редукції числа включень дозволяє отримувати інформацію про справжню антиаденовірусну дію речовини, він специфічний, візуальний, кількісний. Включення можуть бути виявлені методом люмінесцентної мікроскопії при флюорохромії клітин акридинним оранжевим або методом світлової мікроскопії після фарбування клітин гематоксиліном та іншими барвниками. Ми застосовуємо перший метод як більш простий, швидкий та наочний. Клітини для цього слід вирощувати в пробірках або флаконах на смужках накривних скелець. Через 24–48 год поживне середовище зливають, клітини відмивають розчином Хенкса й інфікують аденовірусом. Інфекційний титр вірусу, який використовують для інфікування, визначають за допомогою цього ж цитоморфологічного методу. Рекомендована множинність інфікування становить 10–20 включенняутворюючих одиниць на клітину (ВУО/кл.), що забезпечує інфікування близько 70% клітин, включення в яких зручно спостерігати.

Адсорбцію вірусу проводять протягом 1 год при кімнатній температурі. Після цього клітини відмивають розчином Хенкса від неадсорбованого вірусу і в пробірки вносять підтримуюче середовище (середовище 199 чи Ігла без сироватки) з різними концентраціями речовини. На кожну концентрацію використовують по 3 пробірки, для контролю – 4 пробірки, куди додають середовище без речовини.

Клітини інкубують в термостаті при 37°C протягом 48 год, після чого середовище зливають, клітини відмивають розчином Хенкса і фіксують етиловим спиртом (96°). Клітини можна збе-

рігати в етиловому спирті тривалий час до проведення досліджень. Потім фіксатор зливають, клітини відмивають розчином Хенкса, накривні скельця з клітинами переносять на предметні скельця, флуорохромують акридиновим оранжевим (1:10 000) протягом 5 хв, накривають накривним скельцем і досліджують у люмінесцентному мікроскопі (об. 40x) на наявність внутрішньоядерних ДНК-вмісних включень. У кожному з 3-х скельць визначають відсоток клітин з включеннями (відсоток інфікованих клітин) на 500 підрахованих.

Відсоток пригнічення формування включень під дією кожної концентрації АП визначають відносно контролю, який приймають за 100%, і виражають графічно. Можна користуватись також тією ж формулою, що вказана раніше для визначення відсотка редукції числа бляшок. У результаті проведених досліджень визначають МІК та ХТІ антивірусного препарату.

Слід зазначити, що запропонований цитоморфологічний метод для контролю репродукції аденовірусу не тільки рівноцінний методу бляшок, але має деякі переваги, оскільки дозволяє виявляти окремі інфіковані клітини, а не їх скупчення, якими є бляшки, і експериментувати в режимі одноциклової репродукції вірусу при високій інфікуючій дозі.

### *2.2.3. Метод флуоресціюючих антитіл*

Метод флуоресціюючих антитіл (МФА) передбачає виявлення окремих інфікованих клітин, що містять вірусний антиген. Метод застосовують як для первинного відбору антивірусних речовин і визначення ефективної концентрації за зменшенням кількості клітин, що містять вірусний антиген, так і для встановлення інфекційного титру вірусу.

Клітини фіксують метанолом чи ацетоном і обробляють загальноприйнятими прямим або непрямим варіантами МФА, використовуючи відповідно специфічні антитіла, мічені флуорохромом, чи специфічні антитіла без мітки та мічені антивидові антитіла. Метод дає можливість визначити МІК та ХТІ досліджуваного АП. Метод універсальний, може бути використаний для всіх вірусів, які репродукуються в культурі клітин, рекомендований для скринінгу АП з антиВІЛ-активністю і передбачає використання моноклональних антитіл до р24 вірусу.

### *2.2.4. Імуноферментний аналіз*

Метод універсальний, він передбачає визначення вмісту вірусних білків за допомогою відповідних комерційних тест-систем. Його застосовують для первинного відбору АП, визначення ефективних концентрацій, а також впливу на утворення інфекційного вірусу [9]. ІФА широко застосовується для відбору АП з антиВІЛ-активністю. Для цього клітини, чутливі до ВІЛ, вирощують у мікроплатах за звичайною методикою, інфікують з множинністю 0,005 ТЦД<sub>50</sub> на 1 клітину. Досліджуваний АП додається в підтримуюче середовище. Строк інкубації 5 діб. Порівнюють вміст р24 ВІЛ у культуральному середовищі контрольних та підданих дії АП клітинних культур, визначають відсоток інгібування репродукції ВІЛ. Показники ЕД<sub>50</sub> та ЕД<sub>90</sub> визначають, використовуючи метод лінійної регресії [14].

### *2.2.5 Визначення інгібуючої активності АП за ступенем зниження інфекційного титру вірусу*

Ці дослідження становлять заключний етап у визначенні антивірусної дії речовин *in vitro*. Він полягає в тому, що клітини інфікують заздалегідь визначеною дозою вірусу (0,01 БУО/кл.) і після адсорбції інкубують в середовищі з різними концентраціями речовини до часу максимального накопичення вірусу в контролі. Після цього клітини тричі заморожують і розморожують, осаджують клітинний детрит при 2000 об./хв і в надосаді визначають інфекційний титр вірусу за методом бляшок або за іншим рівноцінним методом, прийнятним для певного вірусу.

Зменшення врожаю вірусу при дії речовини визначають таким чином: наприклад, титр вірусу в контролі становить  $2,97 \cdot 10^9$  БУО/мл, у досліді –  $5,68 \cdot 10^7$  БУО/мл, тому

$$\% \text{ зниження врожаю вірусу} = 100 - \frac{2970000000 - 56800000}{2970000000} \cdot 100 = 98,3\%$$

При проведенні цих досліджень множинність інфікування і час визначення врожаю вірусу повинні бути оптимізовані для кожної вірус-клітинної системи. Досліди щодо виявлення впливу АП на інфекційну активність (врожай) вірусу можна виконувати за умов багато- чи одноциклової репродукції вірусу, перевага частіше віддається другому підходу, бо він забезпечує одержання чіткіших результатів. В одноцикловому досліді необхідно використовувати більшу дозу вірусу і таку множинність, яка забезпечить одночасне інфікування усіх клітин моношару.

### 2.2.6. Критерії оцінки інгібуючої активності АП у системах *in vitro*

Антивірусні препарати, які мають ХТІ 4 або вище при дослідженні інгібуючого впливу на репродукцію вірусу в системах *in vitro* із застосуванням методів редукції бляшок, числа клітин з включеннями, скупченням вірусного антигену чи інших методів виявлення вірусспецифічних продуктів (компонентів), вважаються активними.

Показник ХТІ розраховують і в дослідях по впливу АП на утворення інфекційного вірусу чи врожай вірусу. При цьому деякими авторами [4] рекомендується показник мінімально активної концентрації (МАК), тобто такої, що знижує інфекційний титр вірусу на  $1,25-1,5 \lg$  порівняно з титром вірусу в контролі без додавання АП. У цьому випадку показник ХТІ визначають як відношення МПК до МАК. Речовини, величина ХТІ яких дорівнює 16 або вище, і які знижують титр інфекційного вірусу за умов одноциклового досліду на  $1,25-2,0 \lg$  БУО/мл, вважаються високоактивними та перспективними для подальшого дослідження на тваринах [4]. Деякі зарубіжні дослідники додатково визначають концентрації АП  $ED_{90}$  та  $ED_{99}$ , які відповідно знижують врожай вірусу на 90% ( $1 \lg$  редукції) або 99% ( $2 \lg$  редукції), їх знаходять за допомогою дозозалежної кривої [23].

### 2.2.7. Дослідження дії АП на окремі етапи репродукції та позаклітинний вірус

#### 2.2.7.1. Дослідження дії АП на адсорбцію та проникнення вірусу в клітину

Деякі АП здатні запобігати адсорбції або проникненню вірусу в клітину. Це ідеальні антивірусні речовини, оскільки вони діють на першій стадії взаємодії вірусу з клітиною, попереджаючи проникнення вірусу в клітину і синтез у ній вірусних компонентів. Речовини з такою дією можуть бути виявлені при обробці ними клітин до або під час адсорбції вірусу.

Вплив АП на адсорбцію може бути визначений при використанні вірусу, міченого [ $^3\text{H}$ ]-тимідином та [ $^{35}\text{S}$ ]-метіоїном, при порівнянні зв'язаної контрольними і дослідними клітинами радіоактивності, а також при визначенні інфекційного титру вірусу в рідині, яку видаляли після адсорбції вірусу.

#### 2.2.7.2. Дослідження впливу АП на синтез деяких вірусспецифічних макромолекул

Вивчення впливу АП на синтез вірусних нуклеїнових кислот або вірусних РНК- чи ДНК-полімераз, зворотної транскриптази ВІЛ відбувається при дослідженні дії АП на ранніх стадіях циклу репродукції вірусу. Якщо інгібування має місце на пізніх стадіях репродукції, то,

імовірно, що речовина інгібує синтез чи процесинг вірусних структурних білків, формування «зрілих» віріонів. Найчастіше АП додають безпосередньо після адсорбції вірусу і клітини інкубують в їх присутності до максимального накопичення інфекційного вірусу в контролі. З метою визначення механізму дії речовин проводять ряд додаткових досліджень. Вплив речовин на синтез вірусних білків досліджують за допомогою різних імунологічних тестів і електрофоретичного аналізу мічених ізотопами синтезованих поліпептидів. Окремі дослідження проводяться для з'ясування впливу активних речовин на глікозування та процесинг вірусних білків, формування зрілих та дефектних віріонів.

### 2.2.7.3. Визначення віруліцидної дії АП

Мета цих досліджень – виявлення безпосередньої деструктивної дії АП на позаклітинний вірус. Вони проводяться, якщо в попередніх дослідах вже була виявлена антивірусна активність.

Вірусну суспензію в дозі 1000 ТЦД<sub>50</sub>/мл інкубують з кількома нижчими за МПК концентраціями АП при 37°C протягом 1–4 год (деякі дослідники рекомендують до 24 год), відбираючи щогодини зразки для визначення інфекційного титру вірусу. Як контроль використовують вірусну суспензію, яку інкубують в тих же умовах без АП. Зниження інфекційного титру вірусу на 1,5–2,0 lg і більше порівняно з контролем, особливо в перші години контакту АП з вірусом, свідчить про вираженість віруліцидного ефекту. Речовини з такою дією не є дійсно антивірусними і найменш придатні для досліджень на тваринах та клінічних випробувань. Найчастіше такі речовини в подальшому досліджуються і вживаються як дезінфектанти [4].

### 2.2.8. Вивчення дії АП з використанням курячих ембріонів – *in ovo*

Одна з моделей відбору АП, що широко застосовується у вірусологічних дослідженнях – метод інфікування 10–12-добових курячих ембріонів, що розвиваються (КЕ). Ця модель найчастіше застосовується при вивченні дії АП на віруси грипу та в експериментальних модельних дослідах з вірусом вакцини. Протокол дослідження складається з кількох етапів.

А. Визначення токсичності препарату для КЕ.

Послідовні розведення препарату у фізіологічному розчині (рН 7,2) вводять в алантоїсну порожнину КЕ в об'ємі 0,2 мл. На кожне розведення використовують 4 ембріони. Облік життєздатних і загинувших ембріонів проводять на 2-й і 4-й дні дослідження. За їх співвідношенням визначають токсичну дозу препарату, яка викликає загибель 50% КЕ.

Б. Визначення антивірусної активності.

Після вивчення токсичності препарату визначають максимально переносиму дозу і вводять її в алантоїсну порожнину 10-ти КЕ. Через 1–3 год після цього через той же отвір шкаралупи ембріона вводять 1–10 ЕІД<sub>50</sub> вірусу (титр вірусу грипу А чи В в інфекційних дозах визначається попередньо). Контролем є ембріони, яким вводять препарат без вірусу (КП), вірус без препарату (КВ), препарат порівняння з відомою інгібуючою дією на вірус грипу (ПП), наприклад, ремантадин. Курячі ембріони інкубують у термостаті протягом 48 год (у випадку вірусу грипу А) або 72 год (для вірусу грипу В). Присутність вірусу визначають в реакції гемаглютинації з 1% суспензією курячих еритроцитів [6] і розраховують середній геометричний титр в lgЕІД<sub>50</sub>.

В. Оцінка ефективності провадиться за двома показниками:

– визначення відсотка ембріонів, у яких виявлено вірус (у контрольних та дослідних групах), та розрахунок коефіцієнта захисту (КЗ):

$$КЗ = \frac{\% \text{ КЕ інфікованих в контролі}}{\% \text{ КЕ інфікованих в досліді}} ;$$



– порівняння середнього геометричного титру гемаглютиніну вірусу в алантоїсній рідині контрольної та дослідної груп з розрахунком індексу ефективності (ІЕ) за формулою:

$$IE = \frac{C_k - C_d}{C_k} \cdot 100, \text{ де}$$

$C_k$  – титр вірусу (в ІgEID<sub>50</sub>) у контрольній групі,

$C_d$  – титр вірусу в дослідній групі.

При інтерпретації показників слід брати до уваги, що ІЕ<40% свідчить про відсутність антивірусної дії, ІЕ>40% – наявність дії, а у разі, якщо ІЕ>60% – препарат вважається активним.

Отриманий ІЕ порівнюють з показником препарату порівняння, після чого роблять висновок про перспективність подальших досліджень.

Деякі автори вважають за необхідне визначати так звану пізню токсичність препарату, тобто таку, що реєструється після вилуплення курчат. Для цього додаткову дослідну та контрольну групи по 10 КЕ залишають до повного вилуплення курчат. Перегляд КЕ проводять щоденно протягом усього часу інкубації, що дозволяє досить повно визначити токсичність препарату. Препарати, що проявили пізню токсичність, потребують додаткових досліджень причин цього явища.

### 3. Дослідження антивірусних препаратів *in vivo*

#### 3.1. Загальні вимоги до моделей *in vivo*

Використання тваринних моделей в дослідженні нових АП є необхідним етапом перед випробуванням у клініці. Зрозуміло, що не існує повної відповідності між клінічною картиною захворювання людини і перебігом експериментального процесу у тварин, але використання модельних систем дає змогу оцінити специфічну ефективність та токсичність нової речовини на рівні макроорганізму, порівняти її з відомими антивірусними препаратами, а також вивчити деякі сторони патогенезу вірусного захворювання на фоні дії АП.

Серед факторів, важливих для правильного вибору експериментальної моделі, суттєвими є такі:

1) захворювання, експериментально відтворюване на тварині певного виду, повинно бути максимально подібним за клінічною картиною до захворювання людини, спричиненого цим вірусом, і мати подібний патогенез, включаючи вірусологічну, цитологічну характеристики процесу, реакцію захисних систем макроорганізму;

2) тварини повинні легко утримуватися в лабораторних умовах і бути доступними для придбання.

Важливо, щоб розвиток вірусної інфекції, а саме клінічні симптоми і тривалість переживання інфікованих тварин, корелювали з дозою введеного вірусу, тому скорочення часу проявів цих показників під дією АП дозволяє зробити висновок щодо наявності антивірусного ефекту. Вік, стать тварини і спосіб введення вірусу обумовлюються видом вірусу та клінічною картиною спричиненого ним захворювання.

Загалом рекомендується віддавати перевагу вірусним моделям, відтвореним на лінійних тваринах, бо цим забезпечується більша однорідність одержаних результатів і більша адаптація вірусу, але такі тварини дорожчі і менш доступні. Важливе значення мають власні (ендогенні) віруси лабораторних тварин. Це цитомегаловіруси, герпесвіруси, ретровіруси, аденовіруси, параміксовіруси, які відомі у тварин багатьох видів та птахів, зокрема морських свинок та мишей [22]. Ідеальним було б використання тварин-гнотобіонтів, але практично такі моделі застосовуються зрідка.

Відомі експериментальні моделі на тваринах поділяються на дві групи: гетерологічні та гомологічні [22]. Під першими розуміють експериментальні інфекції лабораторних тварин, спричинені вірусами, патогенними для людини, наприклад герпетичний енцефаліт, викликаний вірусом герпесу звичайного людини 1-го типу (ВГЗ-1). З іншого боку, деяким вірусам

притаманна чітка (сувора) видова специфічність, тобто ці віруси людини не патогенні для тварин і як експериментальна модель може використовуватись тільки гомологічна інфекція, спричинена у лабораторних тварин певного виду гомологічними вірусами. Це стосується, зокрема, цитомегаловірусів, аденовірусів. У разі цитомегаловірусу людини як експериментальна використовується гомологічна цитомегаловірусна інфекція мишей або морських свинок, спричинена цитомегаловірусами мишей або морських свинок. Проте слід відзначити, що використання гомологічних моделей в експериментальній хіміотерапії має певні обмеження, бо антивірусна дія тієї чи іншої речовини досліджується проти вірусу тварин, а не людини, і вони можуть суттєво різнитись між собою за властивостями.

Перелік моделей експериментальних інфекцій, спричинених вірусами, що відіграють важливу роль в патології людини, досить великий, він включає тварин різних видів: гризунів, птахів, морських свинок, людиноподібних мавп (табл. 3).

### ***3.2. Експериментальні моделі захворювань, спричинених представниками родини герпесвірусів***

З огляду на велику увагу, яка приділяється вірусам з родини герпесвірусів як об'єктам хіміотерапії, зупинимось на деяких моделях. Слід підкреслити відсутність універсальної експериментальної моделі для цих вірусів, що обумовлене чіткою видовою патогенністю певного вірусу і, відповідно, чутливістю чи нечутливістю до нього тварин окремих видів. Найдосконаліше вивченими та поширеними є експериментальні моделі, спричинені ВГЗ-1. Це енцефаліт, який досить легко відтворюється при внутрішньочерепному введенні ВГЗ-1 мишам, щурам, хом'якам, мавпам-мармозеткам та новонародженим морським свинкам. Як місцеве ураження, що відповідає за клінічними проявами захворюванню людини, широко застосовують герпетичний кератит, спричинений ВГЗ-1 у кролів. На морських свинках вдалось відтворити латентне збереження ВГЗ-1 у гангліях трійчастого нерва. Цей процес має принципове значення в патогенезі герпетичної інфекції людини, але треба відзначити, що відомі дотепер препарати з антигерпетичною активністю не впливають на нього.

Генітальні ураження відтворені при місцевому введенні ВГЗ 1-го та 2-го типів самицям та самцям морських свинок. Проте у разі ВГЗ-2 експериментальний процес перебігає гяжче, з ураженням інших органів, зокрема ЦНС, він супроводжується латентним збереженням вірусу в головному, спинному мозку, задніх корінцях спинного мозку і можливістю активації та виникнення багаторазових рецидивів генітальних уражень. Отже, ця модель за багатьма ознаками (клінічними, вірусологічними, гістологічними) подібна до герпесу геніталіїв у людини і зручна для експериментальної хіміотерапії [22]. Відома, проте, різна патогенність окремих штампів ВГЗ-2 для морських свинок і різна їх чутливість до антивірусних речовин, тому вибір штаму вірусу в експерименті має велике значення, але бажано використовувати як чутливі, так і резистентні штами. Про активність досліджуваного антивірусного препарату роблять висновок на підставі зменшення вираженості симптомів ураження геніталіїв у інфікованих тварин, скорочення строків одужання та числа рецидивів, наявності неврологічних симптомів та частоти летальності. Також проводять виділення вірусу з уражених органів, визначають його титр і тривалість виділення. Крім того, проводять гістологічні дослідження для виявлення вірусспецифічних уражень у тканинах статевих органів, спинному мозку та спинномозкових гангліях.

На новонароджених морських свинках розроблена експериментальна інфекція, спричинена вірусом вітряної віспи – герпес зостер. Процес характеризується наявністю вірусу в мононуклеарних клітинах протягом кількох тижнів, у цей період вірус може бути виділений з носоглотки і багатьох тканин організму, включаючи ЦНС, інколи спостерігається екзантема. Ця модель, на думку фахівців [22], придатна для випробування антивірусних речовин та дослідження особливостей патогенезу захворювання. Для вірусу вітряної віспи – герпес зостер також розроблено гомологічну модель експериментальної інфекції мавп, інфікованих вірусом мавп.

Для інших представників родини герпесвірусів – вірусу цитомегалії та вірусу Епштейна-Барр відомі і застосовуються тільки гомологічні моделі. Це цитомегаловірусна інфекція морських свинок і мишей, викликана відповідним цитомегаловірусом цих тварин. У першому випадку в інфікованих тварин розвивається мононуклеоз з досить короткочасною віремією, спленомегалія, лімфаденопатія, інтерстиціальна пневмонія, ураження матки, що призводить до вродженого інфікування. Інфекційний процес може хронізуватись і супроводжуватись тривалим виділенням вірусу із слинних залоз. У тварин з ознаками імуносупресії розвивається тяжке ураження внутрішніх органів. Усі ці симптоми близькі до відомих у разі цитомегаловірусної інфекції людини, а тому вказана модель може бути застосована для випробування антивірусних речовин [22].

У випадку інфікування мишей цитомегаловірусом розвивається інтерстиціальна пневмонія, на цій моделі був свого часу досліджений ганцикловір [16]. Як модель захворювання, спричиненого вірусом Епштейна-Барр, вважається латентна інфекція морських свинок, заражених лімфотропним герпесвірусом цих тварин (GPHLV). Вона характеризується ураженням В-лімфоцитів, довічним зберіганням вірусу в селезінці, здатністю до внутрішньоутробного інфікування. Антивірусний ефект досліджуваної речовини може тестуватись за здатністю впливати на латентне збереження вірусу в організмі. Необхідно зазначити, що як об'єкт антивірусних досліджень вірус Епштейна-Барр використовується дуже рідко, особливо в дослідях *in vivo* [16].

### 3.3 Експериментальна модель грипозної інфекції

Адекватною лабораторною моделлю є самці білих нелінійних мишей або мишей лінії BALB, C57W масою 13–14 г. АП в об'ємі 0,2 мл вводять у шлунок спеціальним шприцем, голка якого на кінці має оливу. Вірус грипу штаму А/PR-8 (або інший, адаптований до мишей) в об'ємі 0,1 мл, що містить 1 чи 10 летальних доз, вводять через носові ходи під ефірним наркозом. Для розведення вірусу використовують фізіологічний розчин з рН 7,2.

Схема досліджу на першому етапі передбачає змішане (лікувально-профілактичне) випробування АП, який вводять за 24 і 1 год до інфікування, через 24, 48 і 72 год після інфікування.

Облік активності проводиться за показником летальності, вираховується тривалість інкубаційного періоду (на всю групу тварин, взятих у дослід, в тому числі і загиблих) та за наявністю пневмоній при макроскопічному огляді легенів після розтину трупів тварин.

Оцінка результатів здійснюється за кратністю захисту (КЗ) та індексом ефективності (ІЕ).

Сполуки, які виявляються активними за даними первинного відбору на мишах, підлягають подальшому вивченню за такою схемою.

1. Визначення ХТІ на ембріонах і мишах. Якщо ХТІ на ембріонах  $< 1$ , а на мишах  $< 2$ , то подальше вивчення таких АП недоцільне.

2. Більш докладне вивчення сполук з ХТІ на мишах  $> 2$  передбачає:

а) визначення характеру дії (лікувальне, профілактичне);

б) вивчення механізму антивірусної дії:

- вплив на динаміку розмноження вірусу в організмі тварини,
- вплив на формування противірусного імунітету,
- вплив на тяжкість та характер морфологічних змін,
- вплив на токсичний компонент вірусу.

Для кількісної оцінки токсигенної активності штаму вірусу грипу і відбору сполук з метою профілактики токсикозу рекомендується метод, в основі якого є здатність вірусного токсину ушкоджувати судини, збільшуючи їх проникність. Для відбору сполук з детоксифікуючою дією мишей заражають інтраназально токсигенним штамом вірусу грипу А. Через 3–6 год та 1 і 3 дні мишам з дослідної (лікованої) і контрольної груп вводять внутрішньовенно (в хвостову вену або інтраорбітально) по 0,2 мл 1% розчину синьки Еванса з 5% альбуміну великої рогатої худоби; через 20 хв тварин присипляють ефіром, промивають через серце фізіологічним розчином легені, їх видаляють і готують 10% суспензію, яку екстрагують 50% етиловим спиртом. Після центрифугуван-

ня суспензії визначають концентрацію фарби шляхом фотоколориметрування при зеленому світлофільтрі і довжині хвилі 520–540 нм. Аналіз одержаних даних дозволяє оцінити перспективність сполуки і дати рекомендації щодо подальшого вивчення і клінічних випробувань.

### ***3.4. Методика досліджень***

Для успішного дослідження нових антивірусних препаратів необхідне додержання таких умов [16, 22]. Шлях введення вірусу при інфікуванні експериментальних тварин має бути максимально подібним до природного інфікування людини цим же вірусом, що, однак, не виключає моделювання інфекції при інших шляхах введення вірусу. Дослідження нових АП проводиться більше ніж на одному виді лабораторних тварин, оскільки добре відома різна ефективність АП у разі експериментальної інфекції, спричиненої одним вірусом людини на тваринах різних видів. Вид лабораторних тварин в експериментах *in vivo* повинен відповідати виду культури клітин *in vitro*.

Нові препарати, що виявили більшу активність і/чи меншу токсичність, рекомендують для подальшого вивчення, зокрема визначення більш ефективного та простого режиму введення, дослідження механізму дії. У разі використання гетерологічної моделі експериментальної інфекції постає питання адаптації досліджуваного вірусу людини до організму тварин, що потрібно для чіткого відтворення захворювання і/або загибелі тварин через певний проміжок часу. Дослід необхідно починати з високовірулентних польових штабів вірусу, що пройшли в лабораторії невелике число пасажів. Проте в деяких випадках використання очищеного вірусу, клонованого в культурі клітин, має переваги, бо вдається змоделювати розвиток захворювання і летальність в певні короткі проміжки часу. Світовими центрами з експериментальної хіміотерапії зараз рекомендується використання як еталонних лабораторних, так і вірулентних польових штабів вірусів, безпосередньо виділених від хворих.

Для встановлення дозозалежної дії АП використовують помірно високі дози вірусу. Шлях введення вірусу обумовлюється конкретною моделлю вірусної інфекції, що використовується. Звичайно досліджують дві схеми введення АП: лікувальну та профілактичну. Згідно першої, інфікованим тваринам через добу вводять АП в дозі, розрахованій в міліграмах речовини на кг ваги тварини. Досліджуваний АП вводять шляхом, який забезпечує високий рівень проникнення його до органа-мішені для вірусу. Препарат вводять один чи два рази на добу протягом 4–8 днів. Інколи введення затримують на кілька діб до розвитку клінічних ознак експериментальної інфекції, що подібне до реальної клінічної ситуації.

Системне введення АП проводиться інтраперитонеально, внутрішньом'язово, підшкірно, шляхом інгаляцій, інфузій або з їжею чи питвом. Інколи АП випробовують місцево у вигляді мазей або гелів. У разі профілактичного застосування АП вводиться перед інфікуванням тварини або одночасно з ним [10]. Протокол досліду включає: 1) група досліду: тваринам вводиться вірус і АП, 2) група контролів: а) група тварин, яким вводять тільки вірус, б) тваринам вводять тільки розчинник антивірусного препарату, в) плацебо-група, тобто група інфікованих вірусом тварин, яким вводять розчинник АП.

Ліковані та контрольні тварини спостерігаються певний час, інколи від 14 до 21 доби після припинення антивірусного лікування, що обумовлюється особливостями конкретної вірусної моделі. Щоденно у тварин визначається вираженість тих чи інших ознак хвороби, суттєвих для моделей, за якими оцінюється антивірусний ефект. Одночасно такі ж дослідження виконуються на групі неінфікованих тварин, яким вводять АП для оцінки його токсичності [22].

### ***3.5. Параметри та критерії оцінки дії антивірусних препаратів на моделях *in vivo****

Параметри, за якими оцінюється активність нового АП, можуть бути клінічні, включаючи летальність тварин, вірусологічні, гістологічні. Їх вибір визначається особливостями, притаманними певній експериментальній моделі вірусної інфекції.

Досить часто в експериментальній хіміотерапії порівнюють показники летальності лікованих та контрольних інфікованих тварин. Цей прийом можна застосовувати з вірусом, адаптованим до тварин даного виду та інфікованих летальною дозою. Звичайно використовують три дози (5, 10 та 30 ЛД<sub>50</sub> вірусу). Прикладом використання клінічних критеріїв є порівняння кількості тварин у дослідній та контрольній групах, у яких розвилась чітка грипозна пневмонія при інфікуванні невеликою (1–10 ЛД<sub>50</sub>) дозою вірусу. Облік результатів інфікування та впливу АП може бути проведений методом імуофлуоресценції, за допомогою якого визначаються вірусні ураження (скупчення вірусного антигену) в органах-мішенях у тварин дослідної та контрольної груп. Подібні дослідження можна провести, аналізуючи наявність і титри інфекційності вірусу в органах-мішенях, для чого суспензією органів інфікують чутливу до вірусу культуру клітин чи курячі ембріони, що розвиваються. Звичайно для інфікування тварин використовують мінімальні дози вірусу (1–5 ЛД<sub>50</sub>). Про антивірусний ефект досліджуваного препарату можна судити за зменшенням кількості тварин у дослідній групі порівняно з контрольною, в яких спостерігається зростання титру специфічних противірусних антитіл. Цей методичний прийом може бути використаний при експериментуванні з адаптованим чи неадаптованим вірусом та інфікуванні тварин мінімальною дозою вірусу.

Для оцінки результатів випробування нового антивірусного препарату розраховують відсоток загиблих (захворілих) тварин у дослідній та контрольній групах, середню помилку, вірогідність різниці за t-тестом та рівень значущості різниці [6]. Середню помилку вираховують за формулою:

$$m = \sqrt{\frac{P \cdot (100 - P)}{n - 1}},$$

де P – відсоток загибелі тварин, n – число тварин в групі. Для визначення достовірності різниці в показнику летальності (чи іншому подібному) тварин дослідної та контрольної груп розраховують коефіцієнт t за формулою:

$$t = \frac{P_{\text{контр.}} - P_{\text{досл.}}}{\sqrt{m_{\text{контр.}} + m_{\text{досл.}}}}$$

Різниця вважається достовірною (вірогідною), якщо одержаний коефіцієнт t перевищує значення цього коефіцієнту за таблицею Стюдента при числі ступенів свободи  $n_1 + n_2 - 2$  та довірчому рівні 95% чи, краще 99%. Рівень значущості різниці (p) також визначається за таблицею Стюдента як 100%–95% чи 100%–99%. Тобто різниця між певним показником в дослідній та контрольній групах достовірна, якщо  $p < 5\%$  чи  $p < 1\%$  [1].

Іншими показниками активності досліджуваної речовини є коефіцієнт (кратність) захисту (КЗ) та індекс ефективності (ІЕ). Коефіцієнт захисту вираховується за формулою:

$$КЗ = \frac{\text{відсоток загиблих тварин у контролі}}{\text{відсоток загиблих тварин у досліді}}$$

КЗ означає кратність зменшення в дослідній групі кількості загиблих тварин, яким вводили антивірусну речовину, по відношенню до контролю. Аналогічно цей показник обчислюється в тому разі, якщо досліджується вплив речовини на кількість захворілих тварин. Індекс ефективності (у відсотках) обчислюється за такою формулою:

$$ІЕ = \frac{КЗ - 1}{КЗ} \cdot 100$$

Критерії оцінки активності антивірусної речовини за показником ІЕ прийняті такі: значення ІЕ 0–29% оцінюється як негативне, 30–39%, 40–59%, 60–79% та понад 80% – відповідно в один, два, три та чотири плюси. АП вважається активним, якщо ІЕ дорівнює трьом чи чотирьом плюсам або перевищує 60% [5].

Обов'язковими показниками, що характеризують захисні властивості досліджуваного АП, є такі: СТЖ (середня тривалість життя),  $ED_{50}$  (величина ефективної добової дози препарату, що забезпечує виживання 50% тварин) та ХТІ (хімотерапевтичний індекс). Показник СТЖ визначається як різниця середньої добової тривалості життя тварин у дослідній та контрольній групах за період до загибелі їх в останній. Про наявність антивірусної дії препарату свідчить статистично достовірне збільшення цього показника в дослідній групі порівняно з контрольною.

Показник  $ED_{50}$  визначають за методом Кербера [1] або графічно на кривій, що характеризує дозозалежний ефект речовини і визначається при використанні однієї (постійної) інфікуючої дози вірусу. Принцип її побудови викладений раніше, він включає попереднє обчислення коефіцієнта та рівняння регресії.

Мінімально ефективною дозою досліджуваного препарату є така, що забезпечує виживання не менше половини тварин у дослідній групі при загибелі в контрольній групі 90–95% тварин; досить ефективною можна вважати дозу речовини, що забезпечує виживання 70% тварин, високоефективною – ту, що забезпечує повне виживання тварин у дослідній групі. Якщо загибель тварин у контрольній групі становить 50%, то за активну дозу препарату треба вважати ту, що забезпечить виживання всіх (майже всіх) тварин у дослідній групі. Достовірність різниці в дослідній та контрольній групах визначається за допомогою критерію  $\chi^2$  (хі-квадрат) при рівні значущості  $p$ , що дорівнює 5%.

Завершальним етапом випробувань антивірусного препарату є визначення показника ХТІ за формулою:

$$\text{ХТІ} = \frac{\text{вища нелетальна токсична доза}}{\text{середня ефективна доза (ED}_{50}\text{)}}$$

Необхідним попереднім етапом є визначення токсичності препарату для неінфікованих тварин і обчислення показника  $LD_{50}$  (летальної для половини тварин дози АП) за методом Кербера. Цей показник дає певну інформацію про токсичність препарату *in vivo* і потрібен для вибору робочої дози препарату. Для визначення вищої нелетальної токсичної дози тваринам вводять 1/2, 1/4, 1/8, 1/16, 1/32  $LD_{50}$  та вираховують відсоток виживання тварин [4]. За рекомендацією інших фахівців [10], ХТІ визначають як відношення  $LD_{50}$  до  $ED_{50}$ , тобто в даному випадку дещо знижуються вимоги до токсичності препарату.

Критерії оцінки активності досліджуваної речовини за показником ХТІ та індексом ефективності (ІЕ) рекомендуються такі: речовина, що має ІЕ 70% або вище і ХТІ 8–16, вважається кандидатом для початкових клінічних іспитів і підлягає детальному токсико-фармакологічному вивченню. Речовина, що має ІЕ близько 50% при загибелі в контролі 90% тварин і ХТІ, рівний 4 або вище, розглядається як активна речовина [4].

Слід зауважити, що досить часто токсичність антивірусної речовини для інфікованих тварин значно підвищується. Крім того, бажано, щоб загальна кількість речовини, що вводиться інфікованим тваринам, не перевищувала її вищої нелетальної токсичної дози.

## 4. Вивчення інтерферогенної активності препаратів

### 4.1. Скринінг та оцінка індукторів інтерферону *in vitro*

Одним з методів боротьби з вірусними інфекціями є стимуляція (індукція) інтерферону безпосередньо в організмі, який забезпечує неспецифічну резистентність до широкого кола вірусів [21].

Пошук активних індукторів інтерферону виявив інтерферогенні властивості у вірусів, бактерій і бактеріальних ліпополісахаридів, природних та синтетичних речовин, відомих хіміопрепаратів та інших сполук [5, 10].

У зв'язку з вищенаведеним, актуальним є скринінг різних речовин з метою виявлення їх інтерферогенних та антивірусних властивостей. Накопичений нами досвід дослідження індукторів

інтерферону і вивчення особливостей інтерферогенезу *in vitro* та *in vivo* дозволяє сформулювати основні положення виявлення та оцінки індукторів інтерферону, які наводяться нижче.

**Культура клітин.** Для первинного скринінгу препаратів використовують лейкоцити крові донора 0 (1) групи. Визначення активності утвореного інтерферону проводять на первинно-трипсинізованій культурі клітин шкірно-м'язової тканини ембріонів людини (ШМТЕЛ), диплоїдних клітинах, перещеплюваній лінії L41 (лімфоїдні клітини людини), чутливих до  $\alpha$ - та  $\gamma$ -інтерферону. Клітини в концентрації  $3 \cdot 10^6$  кл./мл вирощують у планшетах з плоским дном в об'ємі 0,2 мл чи в пробірках в об'ємі 1,0 мл. Культури в планшетах потребують термостату з 5%  $\text{CO}_2$ .

**Середовище.** Для вирощування клітин використовують середовища 199 та Ігла у співвідношенні 1:1 з додаванням 10% сироватки крові великої рогатої худоби, інактивованої при  $56^\circ\text{C}$  протягом 30 хв, та антибіотиків. Середовище підтримки (С) складається з середовищ 199 та Ігла з 2% сироватки.

**Постановка досліду:**

а) Визначення індукції інтерферону

До суспензії лейкоцитів людини додають досліджуваний препарат, розчинений у середовищі 199 до концентрації 10–100 мкг/мл. Через 24 год у культуральній рідині визначають наявність інтерферону і його активність.

б) Визначення активності інтерферону

Використовують моношар клітин ШМТЕЛ чи L41. Готують двократні розведення досліджуваної культуральної рідини (з досліду «а») в середовищі 199. На кожне розведення використовують по 4 лунки або пробірки з клітинами. Попередньо з них зливають поживне середовище, промивають чистим середовищем 199 і додають на 24 год до кожної лунки (пробірки) по 0,1 мл (або відповідно 1,0 мл) досліджуваної культуральної рідини, 4 лунки (пробірки) залишають для контролю, замінивши в них поживне середовище на підтримуюче.

Визначення інтерферону проводять за допомогою індикаторного вірусу, зокрема вірусу везикулярного стоматиту (ВВС). Вірус заздалегідь титрують на культурі L41 і використовують у дозі 100 ТЦД<sub>50</sub>. До кожної лунки (пробірки) додають визначену дозу ВВС, для контролю вірусу використовують 4 лунки (пробірки) на кожне його десятикратне розведення від 100 до 0,1 ТЦД<sub>50</sub>. Дослідні і контрольні планшети (пробірки) інкубують 24–48 год у термостаті при  $37^\circ\text{C}$ .

Як препарат порівняння використовують відомий препарат інтерферону з відомою активністю в міжнародних одиницях (МО), найчастіше лаферон чи реаферон, він позначається як стандартний зразок (СЗ). Дослід з ним ставлять паралельно з основним для порівняння дії АП, що вивчається.

Визначення активності інтерферону здійснюється через 24–48 год, коли доза внесеного ВВС (100 ТЦД<sub>50</sub>) викликає повну дегенерацію клітин у контролі вірусу (КВ) за відсутності дегенерації в неінфікованій культурі.

За титр інтерферону в ОД (одиницях дії) приймають величину, зворотну розведенню препарату, при якому культура клітин в 50% лунок (пробірок) була повністю захищена від цитопатогенної дії індикаторного вірусу. Розрахунок активності інтерферону в МО ведеться за формулою:

$$X = \text{титр зразка в ОД/мл} \cdot \frac{\text{активність СЗ (в МО)}}{\text{титр СЗ}}, \text{ де}$$

X – активність інтерферону, індукованого в досліді препаратом, що вивчається, виражена в МО/мл,

ОД – титр інтерферону в дослідній групі,

МО – міжнародні одиниці,

чисельник – активність інтерферону – СЗ в МО, яка відома заздалегідь,

знаменник – титр інтерферону СЗ, отриманий в даному досліді і виражений в одиницях дії, зворотних до розведення препарату.

Після визначення інтерфероніндукуючої активності препаратів у культурі лейкоцитів визначають тип інтерферону, а також динаміку його індукції *in vivo*.

Тип індукованого інтерферону визначають за кислото- та термостійкістю для  $\alpha$ -інтерферону чи кислото- та термочутливістю для  $\gamma$ -інтерферону. Типування індукованих інтерферонів також здійснюється в реакції нейтралізації з моноклональними антитілами до  $\alpha$ - і  $\gamma$ -інтерферонів.

### 4.2. Дослідження інтерферогенної активності АП *in vivo*

Використовують нелінійних білих мишей масою 12–14 г, які є активними продуцентами інтерферону. Препарат вводять внутрішньовенно в об'ємі 0,05 мл в різних дозах, використовуючи по 20 тварин на кожну дозу. Через 2, 4, 8, 12 і 24 год беруть кров від 4 мишей з кожної групи, об'єднують в одну пробірку для кожної групи і отримують сироватку за загальною методикою.

Перед визначенням активності інтерферону сироватку крові обробляють 4N HCl, доводячи рН до 2,0, інкубують при 4°C протягом 2–4 діб (залежно від кислотостійкості досліджуваного вірусу), після чого рН доводять 4N NaOH до 7,2.

При скринінгу неінфекційних індукторів обробку сироватки кислотою та лугом не проводять.

Титрування інтерферону.

Титрування проводять на клітинах L929 – фібробластних клітинах мишей. Посівна концентрація клітин –  $2 \cdot 10^5$  кл./мл. Моношар клітин формується через 24–48 год росту. З пробірок видаляють середовище і вносять по 1 мл сироватки мишей, яка розведена від 1:32 до 1:16384 середовищем С.

На кожне розведення сироватки використовують по 2 пробірки з культурою клітин. Пробірки інкубують при 37°C 24 год, після чого вносять 100 ТЦД<sub>50</sub> ВВС в об'ємі 0,1 мл. За контролю в експерименті слугують пробірки з клітинами, до яких внесено 1 мл середовища С (К клітин), і 3 пробірки з клітинами, до яких додають дозу індикаторного вірусу – контроль вірусу (КВ). Після внесення вірусу пробірки з культурою клітин інкубують при 37°C протягом 24–48 год і проводять облік результатів за умови, що в контролі клітин не спостерігаються цитодеструктивні зміни, а в контролі вірусу реєструється повна дегенерація клітин.

За титр інтерферону приймається кінцеве розведення сироватки, яке забезпечує захист 50% моношару клітин від ЦПД індикаторного вірусу.

Інтерферогенна активність індукторів інтерферону оцінюється за двома показниками [10], необхідними для порівняння індукторів різного походження:

1. Індукуюча інтерферон мінімальна доза (ІДмін).
2. Показник активності індуктора (ПАІ).

За ІДмін приймається мінімальна кількість препарату (в мкг/кг маси тварини), яка викликає продукцію сироваткового інтерферону в титрі не нижче 1:32. Треба мати на увазі, що в сироватках мишей та мавп можуть міститися інгібітори, які пригнічують репродукцію індикаторного вірусу до розведення 1:16.

Для індукторів неінфекційної природи ІД<sub>50</sub> позначається в мкг/кг, для індукторів інфекційної природи – в lg ІД<sub>50</sub>. Так, для мишей ІДмін відомого індуктора полі І:Ц становить 100 мкг/кг маси, а ІДмін для комплексу полі І:Ц з полі L-лізином – 10 мкг/кг. Для мавп ІДмін полі І:Ц становить понад 1000 мкг/кг, а для комплексу полі І:Ц з полі L-лізином – 300 мкг/кг. У разі вірусних індукторів ІДмін для вірусу хвороби Ньюкасла дорівнює 6 lg ІД<sub>50</sub>, для вірусу грипу – 7 lg ІД<sub>50</sub>, для вірусу поліомієліту – понад 8 lg ІД<sub>50</sub>.

Показник ПАІ прийнято виражати у вигляді дробу. У чисельнику вказується мінімальна доза індуктора (мкг/кг маси тварини), яка викликає при внутрішньовенному введенні певному виду тварин утворення максимального титру сироваткового інтерферону. Отже, чисельник



виражає ту межу кількості досліджуваної речовини, вище якої досліджуваний індуктор не здатен виробляти інтерферон, тобто це кількість речовини, яка виводить утворення інтерферону на «плато». У знаменнику ПАІ вказується максимальна кількість (в од/мл) сироваткового інтерферону, індукованого дозою індуктора, вказаною у чисельнику. Загалом ПАІ характеризує інтерфероніндукуючу потенцію даного індуктора.

Так, для бактеріального ліпополісахариду – пірогеналу ПАІ для мишей дорівнює  $8,3/512$ , тобто при введенні мишам пірогеналу в дозі  $8,3$  мкг/кг маси або більшої його кількості продукується не більше 512 одиниць сироваткового інтерферону. Отже, скільки б не підвищували дозу пірогеналу, він не здатний індукувати більшу кількість інтерферону. Для полі І:Ц ПАІ дорівнює  $5/16384$ , а для полі І:Ц з полі L-лізином –  $1/16384$ . Звідси, чим менше чисельник і більше знаменник, тим вищу інтерфероногенну активність має індуктор. У разі вірусів ПАІ для вірусу хвороби Ньюкасла дорівнює  $10^6/16384$ , вірусу грипу –  $10^7/512$ , вірусу поліомієліту –  $10^8/154$ .

Загалом, чим менший дріб, тим активніший індуктор інтерферону.

Якщо знаменник ПАІ не перевищує 32, то подальше дослідження препарату вважається нецільним. При більш високих показниках активності препарату переходять до наступного етапу досліджень.

### **4.3. Вивчення захисної дії активного індуктора інтерферону *in vivo***

Протягом років, що пройшли з моменту відкриття інтерферону (1957), доволі чітко визначено коло захворювань, для яких показано застосування інтерферону і його індукторів. З вірусних інфекцій це передусім грип, ГРЗ (рино-, рео- та РС-вірусні інфекції), герпес, вірусні гепатити, сказ та інші. Тому визначення в експерименті потенційних індукторів інтерферону проводиться саме на цих вірусних моделях на тваринах.

Тварини. Використовуються білі нелінійні миші-самці масою 12–14 г, кролі масою 2–2,5 кг, морські свинки масою 250–300 г, а в деяких дослідах – макаки реус масою 1,5–2 кг.

Доза препарату. Токсичність індуктора ( $LD_{50}$ ) визначають у дослідах на відповідних тваринах шляхом введення послідовних розведень препарату. За робочу дозу слід взяти  $1/4 LD_{50}$ .

Схема дослідження. Робочу дозу індуктора вводять тваринам за 18–24 год до початку експерименту, а далі – щодобово протягом інкубаційного періоду хвороби та в перші 3–5 діб клінічних проявів.

Експериментальна модель. Залежно від завдань обирається вірус, який попередньо титрується на чутливих тваринах. Доза вірусу повинна призводити до загибелі чи прояву інфекції у 50–95% тварин.

Наприклад, рекомендується використовувати вірус грипу, адаптований до мишей штам, що викликає загибель 50–95% тварин при інтраназальному зараженні, або вірус герпесу звичайного 1-го типу, штам MS у титрі  $10^4$ – $10^5$  ТЦД<sub>50</sub>, який викликає у понад 50% кролів герпетичний кератит при скарифікації рогівки з втиранням вірусу.

За необхідності використовують вірус вакцини, який при введенні  $10^6$  ІД<sub>50</sub> викликає вісп'яний кератит у кролів.

Оцінка захисної ефективності індуктора і обчислення його хіміотерапевтичного індексу здійснюється як наведено вище [4,10].

## Література

1. Бейли К. Статистические методы в биологии.– М.: Мир, 1964.– 271 с.
2. Вотьяков В.И., Борейко Е.И., Владыко Г.В. и др. Первичное изучение антивирусных свойств синтетических и природных соединений.– Минск, 1986.– 26 с.
3. Галабов А.С., Галегов Г.А. Методические аспекты химиотерапии вирусных инфекций// *Acta virol.*– 1978.– V.22, №4.– 343–351 p.
4. Галегов Г. А., Пушкарская Н.Л., Леонтьева Н.А., Шобухов В. М., Прасолова З.В. Программа экспериментального химиотерапевтического изучения антивирусных (антигриппозных) препаратов и критерии их поэтапной оценки// *Вопр. вирусол.*– 1976.– №4.– С. 503–507.
5. Ершов Ф.И., Чижов Н.П., Тазулахова Э.В. Противовирусные средства.– Санкт-Петербург, 1993.– 104 с.
6. Ильенко В.И. Методы испытания и оценки противовирусной активности новых препаратов в отношении вируса гриппа. Методические указания.– Ленинград: Всесоюзный НИИ гриппа МЗ СССР, 1973.– 36 с.
7. Носач Л.Н., Дяченко Н.С. Цитопатология аденовирусной инфекции.– К.: Наук. Думка, 1982.– 124 с.
8. Опищенко Г.Г. Заболеваемость вирусными инфекциями в Российской Федерации// *Вопр. вирусол.*– 1997.– №4.– С. 148–152.
9. Фадеева Н.И., Линева И.А., Панишева Е.К. и др.// *Хим.-фарм. журн.*– 1992.– №9–10.– С. 17–20.
10. Чижов Н.П., Ершов Ф.И., Индулен М.К. Основы экспериментальной химиотерапии вирусных инфекций.– Рига: Зинатне, 1988.– 171 с.
11. Allen L.B., Teepe A.G., Kehoe M.J. et al. Antiviral and cytotoxicity evaluation of 3-nitro-3-decaauridine// *Antiviral Res.*– 1989.– V.12, №5–6.– P. 259–268.
12. Baba M., Mori S., Shigeta S., De Clercq E. Selective inhibitory effect of (S)-9-(3-Hydroxy-2-Phosphonylmethoxypropyl) adenine, and 2'-Nor-cyclic GMP on adenovirus replication in vitro// *Antimicrobial Agents and Chemother.*– 1987.– V.31, №2.– P. 337–339.
13. Barquero A.A., Alche L.E., Coto C.E. Antiviral activity of meliacine on the replication of a thymidine kinase-deficient mutant of Herpes simplex virus type 1 alone and in combination with acyclovir// *Antimicrobial Agents.*– 1997.– V.9.– P. 49–55.
14. Chong K-T., Pagano P.I. Inhibition of human immunodeficiency virus type 1 infection in vitro by combination of delavirdine, zidovudine and didanosine// *Antiviral Res.*– 1997.– V.34, №1.– P. 51–63.
15. De Clercq E., Sakuma T., Baba M. et al. Antiviral activity of phosphonylmethoxyalkyl derivatives of purine and pyrimidines// *Antiviral Res.*– 1987.– V.8.– P. 261–272.
16. Faulds D., Heel R.C. Ganciclovir. A review of its antiviral activity, pharmacokinetic properties and therapeutic efficacy in cytomegalovirus infections// *Drugs.*– 1990.– V.39, №4.– P. 597–638.
17. Fennewald S.M., Mustain S., Ojwang J., Rando R.F. Inhibition of Herpes simplex virus in culture by oligonucleotides composed entirely of deoxyguanosine and thymidine// *Antiviral Res.*– 1995.– V.26.– P. 37–54.
18. Furman P. A., Glair M.H.St., Fyfe J.A. et al. Inhibition of herpes simplex virus-induced DNA polymerase activity and viral DNA replication by 9-(2-Hydroxyethoxymethyl)guanine and its triphosphate// *J. Virol.*– 1979.– V.32, №1.– P. 72–77.
19. Garozzo A., Pinizzotto M., Furneri P.M. et al. Inhibitory effect of 3'-imino-5-phenyl-3H-1,2-dithiole on poliovirus type 1 replication in vitro// *Antiviral Res.*– 1990.– V.14, №5–6.– P. 267–278.
20. Gordon Y.J., Romanowski E., Araullo-Cruz T. et al. Inhibitory effect of (S)-HPMPC, (S)-HPMPA and 2'-nor-cyclic GMP on clinical ocular adenoviral isolates is serotype-dependent in vitro// *Antiviral Res.*– 1991.– V.16.– P. 11–16.

21. Ho M., Enders J.F. An inhibitory of viral activity appearing in infected cell cultures//Proc. Nat. Acad. Sci.– 1959.– V.260.– P. 141–143.
22. Hsiung G.D., Chan V.F. Evaluation of new antiviral agents. II. The use of animal models//Antiviral Res.– 1989.– V.12, №5–6.– P. 239–258.
23. Hu J.M., Hsiung G.D. Evaluation of new antiviral agents: 1. In vitro perspectives//Antiviral Res.– 1989.– V.11, №5–6.– P. 217–232.
24. Oliver S., Bublely G., Crumpacker C. Inhibition of HSV-transformed murine cell by nucleoside analog 2'-NDG and 2'-nor-cGMP; mechanism of inhibition and reversal by exogenous nucleozides//Virology.– 1985.– V.145, №1.– P. 84–93.
25. Rosenwirth B., Kis Z.L. In vivo efficacy of SDZ 35–682, a new picornavirus capsid-binding agent//Antiviral Res.– 1995.– V.26.– P. 1–9.
26. Rosenwirth B., Streicher W., De Clercq E. et al. In vitro and in vivo antiviral activity of 2'-fluorinated arabinosides of 5-(2-haloalkyl)uracil//Antiviral Res.– 1987.– V.7.– P. 271– 287.
27. Smee D.F., Barnett B.B., Sidwell R.W. et al. Antiviral activities of nucleozides and nucleotides against wild-type and drug-resistant strains of murine cytomegalovirus//Antiviral Res.– 1995.– V.26.– P. 1–9.
28. Wagstaff A.J., Bryson H.M. Foscarnet. A reappraisal of its antiviral activity, pharmacokinetic properties and therapeutic use in immunocompromised patients with viral infections//Drugs.– 1994.– V.48, №2.– P. 199–226.

## ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНЕ ВИВЧЕННЯ НОВИХ ГІПОГЛІКЕМІЧНИХ ЗАСОБІВ

Полторак В.В.,  
Горбенко Н.І.

### Вступ

У фармакотерапії цукрового діабету головною метою залишається досягнення стану, близького до нормоглікемії, що дозволяє попередити та послабити розвиток діабетичних мікро- та макроангіопатій, які суттєво знижують тривалість та якість життя хворих.

Підвищення концентрації глюкози в плазмі крові за умов цукрового діабету 2 типу виникає внаслідок двох патогенетичних механізмів: прогресуючого зниження секреції інсуліну та резистентності до дії гормону, що зумовлено порушенням метаболічних процесів у різних органах, перш за все, у печінці, підшлунковій залозі та м'язах. Відомо, що за підвищення глюкози в крові хворих натще відповідальні процеси, які призводять до надмірної продукції глюкози печінкою (гальмування гліколізу та активація глюконеогенезу). В той же час зростання концентрації цукру в крові після прийому їжі (постпрандіальна глікемія) залежить від процесів, які гальмують утилізацію глюкози периферичними тканинами, насамперед, м'язами. До них належить зниження синтезу глікогену через послаблення активності глікогенсинтази та окислення глюкози внаслідок дефекту в піруватдегідрогеназному комплексі. Порушення секреторної функції панкреатичних бета-клітин, яке проявляється в гальмуванні та послабленні першої фази інсулінової відповіді на підвищений рівень глюкози, також сприяє зростанню базальної та постпрандіальної глікемії [1].

У зв'язку з тим, що гіперглікемія у хворих на цукровий діабет характеризується підвищенням порівняно з нормою рівнем цукру в крові як натще, так і після прийому їжі, корекції потребують обидва її компоненти.

Враховуючи мультифакторіальність патогенезу гіперглікемії за умов цукрового діабету 2 типу, існуючі та потенційні гіпоглікемічні препарати можуть виказувати цукрознижувачий ефект різними шляхами. Головними з них є гальмування абсорбції вуглеводів у кишечнику, зниження продукції глюкози печінкою, посилення секреторної функції панкреатичних бета-клітин, підвищення чутливості периферичних тканин до дії інсуліну [2]. При цьому, деякі гіпоглікемічні препарати можуть діяти не в одному, а одразу в кількох напрямках.

Слід зазначити, що деякі групи пероральних гіпоглікемічних препаратів (бігуаніди, тіазолідиндіони, інгібітори  $\alpha$ -глюкозидази) можуть застосовуватися не тільки у хворих на цукровий діабет 2 типу з достатньо збереженим інсулін-продукуючим апаратом підшлункової залози, а також у хворих на цукровий діабет 1 типу з абсолютним дефіцитом ендogenous інсуліну. В останньому випадку вищезазначені препарати дозволяють знизити дозу екзогенного інсуліну для забезпечення відповідного глікемічного контролю і тим самим зменшити ризик атерогенезу [3].

Необхідність складання патогенетично обґрунтованих показань для клінічного дослідження нових гіпоглікемічних засобів обумовлює необхідність застосування на доклінічній стадії різних моделей інсулінзалежного та інсуліннезалежного цукрового діабету, які відтворюють

провідні ланки патогенетичного процесу у людини. Беручи до уваги важливість генетичного фону для реалізації специфічної дії антидіабетичних препаратів, вважається доцільним використання тварин як з хімічно-індукованими, так і з генетично-детермінованими формами абсолютної та відносної інсулінової недостатності [4]. При цьому визначальним критерієм для вибору моделі є передбачуваний механізм дії нового антидіабетичного засобу та максимальна патогенетична адекватність формі цукрового діабету та стадії захворювання, за яких планується клінічне вивчення препарату.

Дослідження повинні виконуватися за умов додержання принципів гуманного ставлення до тварин в відповідності до Етичного кодексу Ради міжнародних медичних організацій по проведенню експериментів з використанням тварин (1985).

## **1. Первинний фармакологічний скринінг нових речовин з гіпоглікемічними властивостями**

Можливу гіпоглікемічну активність нової речовини оцінюють за змінами концентрації глюкози крові тварин після її одноразового введення. Якщо досліджувана сполука належить до хімічного класу, представники якого на сьогодні не застосовуються у клінічній практиці як гіпоглікемічні засоби, первинний скринінг потрібно проводити на двох видах теплокровних тварин (бажано на гризунах та негризунах). Якщо нова речовина належить до відомого класу лікарських препаратів, наприклад до похідних сульфонілсечовини або до бігуанідів, то цукрознижуючий ефект оцінюється на одному виді тварин, який чутливий до гіпоглікемічної дії даної групи. Так, до цукрознижуючого ефекту бігуанідів найбільш чутливими є мурчаки та щури, а малочутливими або зовсім нечутливими – кролі та собаки [5]. Дослідження гіпоглікемічних властивостей препаратів сульфонілсечовини доцільно проводити на щурах, кролях та собаках.

Для підвищення відсотка виявлення сполук з гіпоглікемічною дією вже на стадії первинного скринінгу рекомендується проведення вибіркового дослідження на тваринах з цукровим діабетом. Так, відомо, що деякі цукрознижуючі засоби (наприклад, тіазолідиндіони) не змінюють рівень глюкози в крові інтактних тварин, виказуючи суттєвий гіпоглікемічний ефект у діабетичних мишей з ожирінням [6].

При проведенні експериментів на інтактних тваринах необхідно пам'ятати, що виявлення гіпоглікемічного ефекту залежить не тільки від дози сполуки, але й від умов її всмоктування в шлунково-кишковому тракті. Так, у гризунів на відміну від людини та м'ясоїдних тварин (собаки, кішки) всмоктування препаратів сульфонілсечовини гальмується через незначну кількість лугів у кишечнику. Тому останніми препаратами сульфонілсечовини потрібно вводити у вигляді натрієвої солі або з додаванням луку, який утворює з вищезазначеними похідними добре розчинні солі, що сприяє їх швидкому всмоктуванню [5].

Виразність цукрознижуючого ефекту препаратів у інтактних тварин також залежить від характеру харчування і тому скринінг необхідно проводити на тваринах, які щонайменше протягом тижня отримували стандартний корм з достатньою кількістю вуглеводів. Для того щоб виключити вплив їжі на всмоктування досліджуваної речовини необхідно припинити годування тварин перед дослідом: кролів, собак – за 16–18 годин; мишей, щурів та інших невеликих тварин – за 4–6 годин (для зручності в деяких випадках їх залишають голодними протягом ночі). Більш тривале голодування небажане в зв'язку з тим, що в цьому випадку знижується виразність цукрознижуючого ефекту препарату.

Речовину, що досліджується, потрібно вводити перорально за допомогою зонда у вигляді водного розчину або 3–5% тонкодисперсної водної емульсії, стабілізованої твіном-80, у випадку нерозчинності сполуки в воді. Доза препарату, частота та тривалість відбору проби крові для аналізу визначаються експериментатором в залежності від класу сполуки та виду тварин.

Визначення глюкози в крові проводиться будь-яким інформативним методом [7] і в тому числі з використанням експрес-аналізаторів («Ексан-Г», «HIPOGUARD Supreme, «GLUCO-CARD», «One-Touch» та інші). Звичайно у кролів та більш великих тварин проби крові для аналізу беруть до та після перорального введення препарату щогодини протягом 8–12 годин, у щурів – до та через 2, 4, 6, 8 годин після введення речовини. Скринінг проводиться не менш ніж з двома дозами речовини, одна з яких в 5–10 раз перевищує іншу. Більшість цукрознижуючих препаратів діють в діапазоні доз від 5 мг/кг маси тіла до 200 мг/кг маси тіла. Вибір доз для дослідження нової речовини повинен базуватися на ефективності лікарських засобів, які є найближчими структурними аналогами даної речовини, або подібні їй за механізмом цукрознижуючої дії, що передбачається. На кожну дозу при проведенні скринінгу необхідно використовувати щонайменше 3 кролів та 4 щурів. В кожну серію експерименту необхідно також обов'язково включати контрольну групу (тварини, які отримують плацебо) та групу, якій вводять відомий цукрознижуючий препарат, що максимально наближається до нової речовини за структурою або за механізмом дії. Доцільність такого «подвійного контролю» зумовлена наявністю сезонних та добових коливань в секретії інсуліну, його біологічній дії та толерантності до вуглеводів [8].

При встановленні гіпоглікемічного ефекту в першу чергу потрібно визначити мінімально ефективну (порогову) та максимально ефективну дози. *Мінімально ефективна доза* – це доза, яка призводить до зниження базальної глікемії у інтактних тварин (або за умов цукрового діабету) не менш, ніж на 10% порівняно з вихідним рівнем після вирахування спонтанних коливань вмісту глюкози в крові контрольної групи, що отримувала плацебо [9]. *Максимально ефективна доза* – це доза, підвищення якої не призводить до посилення цукрознижуючої дії речовини, тобто не викликає подальшого зменшення концентрації глюкози в крові [10].

При оцінці цукрознижуючої дії речовини в динаміці, окрім визначення відсотку падіння глікемії в окремих інтервалах дослідження та часу досягнення максимального гіпоглікемічного ефекту, доцільно розраховувати інтегральний показник – площину під кривою зниження глюкози в крові протягом експерименту (ммоль/л·хв) за допомогою комп'ютерної програми «Mathlab». Аналізуючи всі показники, вираховують коливання глікемії, які спостерігають в контрольній групі, що отримувала плацебо. Кінцевий результат порівнюють з гіпоглікемічним ефектом відомого цукрознижуючого засобу, який використовували як референс-препарат.

## 2. Вивчення специфічної (антидіабетичної) дії біологічно активних сполук

При оцінці специфічної (антидіабетичної) дії нової речовини необхідно визначити її переваги над існуючими лікарськими засобами за показниками гіпоглікемічної активності, токсичності або інші додаткові властивості, які обґрунтовують доцільність впровадження нової сполуки в якості фармакологічного препарату в клінічну практику. Якщо досліджується відомий препарат, синтез якого був відтворений за нових умов, то потрібно довести подібність його терапевтичної активності оригіналу.

Вивчення специфічної антидіабетичної активності речовини проводять на моделях порушеної толерантності до вуглеводів та цукрового діабету різного генезу, вибір яких залежить від передбачуваного механізму дії сполуки, що вивчається. Характеристика цукрознижуючого ефекту нової речовини обов'язково включає оцінку її активності за умов одноразового та тривалого використання (не менше 2–3 тижнів). Останнє необхідне для того, щоб в повній мірі проявився реабілітаційний ефект сполуки на показники гомеостазу глюкози.

Для хронічного призначення використовують максимально ефективну дозу речовини, яка не призводить до клінічних проявів гіпоглікемії, що супроводжуються розвитком контрінсулінових реакцій і знижують терапевтичну активність сполуки.

Кожна серія експериментів повинна також включати групу діабетичних тварин, які отримують за аналогічною схемою плацебо (діабетичний контроль), групу інтактних тварин (інтактний контроль) та групу діабетичних тварин, яким вводять референс-препарат. Слід зазначи-

ти, що вихідний рівень гіперглікемії в групі діабетичного контролю та в групі діабетичних тварин, які отримують нову речовину та стандартний препарат, повинен бути однаковим.

Характеристику глюкозного гомеостазу проводять за рівнем базальної глікемії, інсулінемії та толерантності до вуглеводів, яку визначають за допомогою тестів навантаження глюкозою.

*Оральний тест толерантності до глюкози (ОТТГ)* – глюкозу (3 г/кг маси тіла) вводять за допомогою зонду перорально. Проби крові для аналізу глюкози відбирають до та через 15, 30, 60 та 120 хвилин після навантаження.

*Внутрішньовенний тест толерантності до глюкози (ВТТГ)* – глюкозу (500 мг/кг маси тіла) вводять внутрішньовенно. Проби крові для аналізу глюкози відбирають до та через 5, 10, 30 та 60 хвилин після навантаження.

*Внутрішньоочеревинний тест толерантності до глюкози (ВЧТТГ)* – глюкозу (2 г/кг маси тіла) вводять внутрішньоочеревинно. Проби крові для аналізу глюкози відбирають до та через 15, 30 та 45 хвилин після навантаження.

*Глюкозоінфузійний тест* – внутрішньовенне швидке введення глюкози (330 мг/кг маси тіла), а потім 60-хвилинна інфузія з постійною швидкістю (12 мг/кг маси тіла). Проби крові для аналізу глюкози відбирають до та через 5, 10, 30 та 60 хвилин від початку інфузії.

При аналізі результатів тесту толерантності до вуглеводів порівнюється характер глікемічної реакції (глікемічна крива) до та після хронічного застосування нової цукрознижуючої речовини. Обов'язковим є також аналіз в кожній серії експерименту глікемічних кривих в групах інтактного і діабетичного контролю та діабетичної групи, що отримувала стандартний препарат. Це дозволить коректно оцінити терапевтичний ефект сполуки на утилізацію глюкози, що особливо важливо в випадку відсутності помітного впливу на базальний рівень глюкози в крові.

Глікемічну реакцію при проведенні тесту толерантності до вуглеводів оцінюють за показниками інтегральної глікемії та за площею під глікемічними кривими (ммоль/л·хв). Інтегральну глікемію розраховують, складаючи показники в усіх досліджуваних інтервалах при проведенні тесту. Площу під глікемічними кривими обчислюють за допомогою комп'ютерної програми «Mathlab».

Інсулінемію оцінюють за допомогою наборів для імунорадіометричного та імуноферментного визначення.

Слід зазначити, що у випадку хронічного застосування речовини (понад 1 місяць) на великих тваринах (кролі, собаки) більш інформативним показником зниження цукру в крові може бути не базальна глікемія, а вміст глікозильованого гемоглобіну (HbA1C) [11].

З метою оцінки можливого впливу речовини на морфоструктуру ендокринної частини підшлункової залози після завершення хронічного експерименту необхідно провести гістологічний аналіз даного органу у тварин усіх чотирьох груп.

У випадку дослідження нової цукрознижуючої сполуки на стадії доклінічного вивчення необхідно з'ясувати домінуючий напрямок в реалізації її специфічної активності. Насамперед потрібно визначити вплив речовини на секреторну реакцію панкреатичних бета-клітин та на чутливість периферичних тканин до дії інсуліну.

Секреторну реакцію панкреатичних бета-клітин оцінюють за рівнем інсуліну в сироватці крові як у базальному стані, так і у відповідь на підвищений рівень глюкози (під час тесту толерантності до вуглеводів).

Поглиблені дослідження бета-цитотропної дії пероральних цукрознижуючих препаратів можуть включати вивчення біосинтезу та секреції інсуліну ізольованими острівцями Лангерганса підшлункової залози щурів та мишей. Крім того, вміст інсуліну в підшлунковій залозі також є інтегральним показником синтезу та секреції гормону бета-клітинами.

Порушення секреції інсуліну, які підлягають фармакологічній корекції, можна відтворити за допомогою таких експериментальних моделей інсулін-незалежного цукрового діабету, як неонатально-індукований стрептозотоциновий діабет та стрептозотоциновий діабет з попереднім введенням нікотинаміді.

Чутливість периферичних тканин до дії інсуліну визначають за методом НОМА та за допомогою «короткого інсулінового тесту».

*НОМА (Homeostatic model assessment)* – це математична модель інсулін-глюкозного зв'язку, яка дозволяє на основі концентрації глюкози та інсуліну в плазмі крові натщесерце визначити показники інсулінорезистентності та функції бета-клітин. Модель побудована на припущенні, що ступінь базальної гіперглікемії визначається комбінованим впливом дефіциту функції бета-клітин та інсулінорезистентності [12].

$$\text{Коефіцієнт інсулінорезистентності} = \frac{\text{інсулін натще} \cdot \text{глюкоза натще}}{\text{глюкоза натще} - 3,5}$$

$$\text{Коефіцієнт функції бета-клітин глюкоза} = \frac{20 \cdot \text{інсулін натще}}{\text{глюкоза натще} - 3,5}$$

(концентрація інсуліну визначається в мк Од/мл, а концентрація глюкози – в ммоль/л).

Чутливість до інсуліну та функцію бета-клітин за методом НОМА звичайно виражають у відсотках щодо показників інтактної групи.

*Короткий інсуліновий тест* – дозволяє оцінити чутливість як печінки, так і периферичних тканин до дії інсуліну, враховуючи гальмування продукції глюкози в печінці та підвищення утилізації глюкози м'язами внаслідок ефекту гормону. Чутливість до інсуліну визначають, розраховуючи відсоток зниження базальної глікемії через 30 хвилин після внутрішньочеревинного введення гормону тваринам натщесерце (1 Од/кг маси тіла) [13].

Найбільш адекватними моделями для вивчення впливу нової речовини на чутливість периферичних тканин до дії інсуліну є модель інсулінорезистентності, індукована введенням дексаметазону, та стрептозотоциновий діабет з попереднім введенням нікотинаміді.

При вивченні гіпоглікемічної активності нових сполук окрім дослідження глікемії та інсулінемії доцільно оцінювати ліпідний обмін (за показниками холестеролу, ліпопротеїнів, неестерифікованих жирних кислот, інтенсивності перекисного окислення ліпідів). Визначення цих параметрів в поєднанні з показниками вуглеводного обміну дозволяє більш повно оцінити специфічну дію нового фармакологічного засобу та чітко визначити показання до його застосування. Крім того, наявність у нової речовини поряд з гіпоглікемічною активністю антиоксидантних властивостей та коригуючого впливу на ліпідний профіль, що може сприяти профілактиці та гальмуванню діабетичної судинної патології, дозволить обґрунтувати переваги даної сполуки перед існуючими цукрознижуючими препаратами.

Для вивчення ангіопротекторного ефекту нової речовини необхідно проводити дослідження на тваринах з хронічними формами інсулінової недостатності (3–12 місяців).

### 3. Хімічно індуковані моделі цукрового діабету

#### *Інсулінзалежний цукровий діабет*

##### *Алоксановий діабет*

Алоксан – нестабільний піримідин (2,4,5,6-тетраоксогексагідропіримідин), якому притаманна діабетогенна дія. В невеликій кількості він знаходиться в організмі ссавців та людини. Існують дані про можливість підвищення вмісту ендogenous алоксану в біологічних рідинах людини та тварин з цукровим діабетом, але його патогенетична роль зостається ще нез'ясованою [14].

При моделюванні діабету необхідно враховувати, що діабетогенний ефект алоксану залежить від швидкості та способу введення (внутрішньовенний, підшкірний, внутрішньом'язовий, внутрішньоочеревинний), концентрації розчину, а також видових особливостей тварин. За умови одноразового внутрішньовенного введення діабетогенні дози алоксану становлять (мг/кг): для мави – 100–150, собак – 50–100, кролів – 150–200, щурів – 50–75; за



умов підшкірного введення (мг/кг): для щурів – 150–200, мишей – 350–400. Деякі види тварин (наприклад, мурчаки) не чутливі до діабетогенної дії алоксану. Вищенаведені дози алоксану є діабетогенними тільки для молодих статевозрілих тварин, які голодували протягом 16–18 годин. Крім того, слід відзначити широку варіабельність чутливості тварин до діабетогенної дії алоксану в межах одного виду.

Після введення в організм алоксан зв'язується з мембранами панкреатичних бета-клітин та призводить до швидкого зниження секреції інсуліну. Приблизно через дві години після ін'єкції гіперглікемія змінюється виразною гіпоглікемією та значним виділенням інсуліну за рахунок загибелі бета-клітин. Через одну-дві доби розвивається стійка гіперглікемія. Механізм бета-цитотоксичної дії інсуліну ймовірніше за все зумовлений деструктивною дією гідроксильних та супероксидних радикалів. Токсичний ефект алоксану проявляється протягом перших хвилин після введення, виразна інсулінова недостатність – через кілька днів [15].

Останніми роками розроблена також модель алоксанового діабету аутоімунного генезу у щурів з підвищеним рівнем інтерлейкіну-2. Ця форма діабету індукується у щурів лінії «темний Август» з підвищеним рівнем інтерлейкіну-2 шляхом щоденних внутрішньовенних ін'єкцій алоксану (25 мг/кг маси тіла) протягом 5 діб. Лікування тварин циклоспорином А (10 мг/кг маси тіла) протягом 7 діб гальмує маніфестацію захворювання [16].

До недоліків алоксанових моделей слід віднести відсутність селективної дії на бета-клітини підшлункової залози. Токсичні зміни, не пов'язані з розвитком діабету, спостерігаються і в інших органах. Крім того, в деяких випадках спостерігається нестабільний перебіг цукрового діабету. Слід зазначити, що моделі алоксанового діабету дозволяють відтворити абсолютну інсулінову недостатність, тобто належать до інсулінзалежної форми цукрового діабету. В зв'язку з цим, вони не можуть бути використаними для дослідження специфічної активності цукрознижуючих препаратів, які проявляють ефект тільки за умов наявності залишкової секреторної функції бета-клітин (наприклад, похідні сульфонілсечовини або бігуанідів). Разом з тим, відсутність токсичних змін у тимусі при моделюванні інсулінової недостатності алоксаном, на відміну від тимотоксичних ефектів високих доз стрептозотоцину, створює певні переваги при оцінці біологічного ефекту інсуліну та речовин з інсуліноподібною дією.

#### *Високодозовий стрептозотоциновий діабет*

Стрептозотонин – антибіотик (2-дезоксидрозо-2-метилнітрозаміно-карбоніл-аміно-D-глюкопіраноза), виказує специфічний ефект на панкреатичні бета-клітини. Вірогідно, що фрагмент нітрозосечовини відповідає за токсичну дію препарату, а 2-дезоксиглюкоза – за селективність ефекту по відношенню до бета-клітин [17]. Порівняно з алоксаном стрептозотонин є більш ефективним в індукції діабету. В панкреатичних бета-клітинах стрептозотонин викликає розрив в молекулах ДНК. Це призводить до активації процесів репарації за допомогою ферменту полі-АДФ-рибозосинтази, який як кофермент використовує НАД і таким чином сприяє вичерпанню його запасів в бета-клітинах та їх загибелі [18].

Високодозовий стрептозотоциновий діабет моделюється шляхом одноразового внутрішньочеревиного або внутрішньовенного введення препарату в організм. Враховуючи, що стрептозотонин дуже нестабільний в водному розчині, його вводять в організм не пізніше, ніж через 5 хвилин після розчинення в цитратному буфері (рН-4,5). Після ін'єкції тварини повинні отримувати воду та їжу в достатній кількості для того, щоб запобігти розвитку гіпоглікемічної коми. Діабетогенна доза для мишей складає 200 мг/кг маси тіла при внутрішньоочеревиному введенні, а для щурів – 50–70 мг/кг при внутрішньовенному введенні. Під впливом стрептозотоцину у мишей та щурів розвивається гострий некроз бета-клітин та видалення з них інсуліну, виразна гіперглікемія розвивається через 24–72 години і зберігається протягом тривалого часу.

Стать, вік тварин та стан харчування мають важливе значення для реалізації діабетогенних ефектів стрептозотоцину. Найбільша чутливість спостерігається у молодих статевозрілих

самців, які голодували. Показано, що у гризунів одноразова висока доза стрептозотоцину поряд з деструкцією бета-клітин може викликати неспецифічні порушення в альфа-клітинах, які синтезують глюкагон. За гормонально-метаболічними змінами високодозовий стрептозотоциновий діабет багато в чому подібний до цукрового діабету 1 типу у людини. Але слід пам'ятати, що в даному випадку абсолютна інсулінова недостатність розвивається внаслідок прямого токсичного ураження бета-клітин без участі автоімунних механізмів деструкції, які мають місце в патогенезі цукрового діабету 1 типу у людини [19].

### *Низькодозовий стрептозотоциновий діабет*

У мишей повторне внутрішньоочеревинне введення субдіабетогенних доз стрептозотоцину (40 мг/кг маси тіла) протягом 5 діб призводить до повільного розвитку інсулінзалежного цукрового діабету з виразним автоімунним компонентом, який подібний за провідними патогенетичними ознаками до цукрового діабету 1 типу у людини [20]. Найбільш чутливі до повторних субдіабетогенних доз стрептозотоцину молоді статевозрілі самці мишей віком 2–3 місяці, які попередньо голодували протягом 16 годин. Починаючи з введення останньої дози стрептозотоцину кілька днів відмічається зростання інсулінової залежності, яке завершується некрозом бета-клітин та важкою гіперглікемією. Одразу після того, як з'являється первинна гіперглікемія, відмічається інтенсивна інфільтрація панкреатичних островців макрофагами та лімфоцитами (інсуліт), подібно тій, що спостерігається у молодих людей з діабетом 1 типу (інсулінзалежний) на ранніх стадіях захворювання. Максимальна виразність інсуліту відмічається на 12–14 добу після першої ін'єкції стрептозотоцину. Отримані докази наявності при цій формі діабету, подібно до діабету 1 типу у людини, антитіл до поверхневих та цитоплазматичних антигенів островцевих клітин, аберантної експресії в них Іа антигенів та інших реакцій органоспецифічного (спрямованого проти бета-клітин) автоімунітету.

Для мишей характерні виразні відмінності в чутливості різних ліній до субдіабетогенних доз стрептозотоцину: високочутливі лінії – C57Bl/KsJ, DBA/2J, BALB/cAn ; нечутливі лінії – C57Bl/6J, C3H/An, C57L/J.

### *Дитизоновий діабет*

Дитизон являє собою 8-гідроксибензоніридин, який здатен утворювати хелатні комплекси з цинком та індукувати інсулінзалежний цукровий діабет у кролів та мишей. Для пояснення розвитку інсулінової недостатності під впливом дитизону Н.Окамото (1942) сформулював «цинкову теорію», згідно якій цинк взаємодіє з вище означеним діабетогенним чинником, утворюючи токсичні комплекси, що призводить до незворотних деструктивних змін в панкреатичних бета-клітинах. Більшість досліджень свідчать про те, що цинк бере активну участь у процесах синтезу, депонування та секреції інсуліну і в основному знаходиться в секреторних гранулах бета-клітин. Вважають, що іони цинку сприяють перетворенню проінсуліну в інсулін та виведенню гормону у вигляді стійкої кристалічної форми цинк-інсуліну [21].

Абсолютну інсулінову недостатність прямого бета-цитотоксичного генезу викликають за допомогою внутрішньовенної ін'єкції дитизону (35 мг/кг маси тіла) самцям кролів породи Шиншила масою 2,5–3 кг, які попередньо голодували протягом 16–18 годин. Вже на другу добу після ін'єкції дитизону у тварин спостерігається різке підвищення базальної гіперглікемії, яке продовжується протягом наступних 5 діб і зостається на досягнутому високому рівні тривалий час. Базальна гіперглікемія також супроводжується 50% зниженням концентрації інсуліну в сироватці крові. Слід відзначити, що в даному випадку відтворюється тільки абсолютний дефіцит інсуліну без включення автоімунних компонентів, що характерно для цукрового діабету 1 типу у людини.

Незважаючи на те, що зв'язок між цукровим діабетом та метаболічними порушеннями цинку спостерігається як у людини, так і у експериментальних тварин, в той же час його роль в патогенезі інсуліннезалежного цукрового діабету зостається ще не до кінця з'ясованою.

Інтерес до моделей цукрового діабету, індукованих сполуками з хелатоутворюючими властивостями (дитизон, 8-гідроксихінолін та інші), в останні роки зростає в зв'язку з техногенним забрудненням навколишнього середовища, що може підвищити ризик розвитку абсолютної інсулінової недостатності прямого бета-цитотоксичного генезу.

### ***Інсуліннезалежний цукровий діабет***

#### *Неонатальний стрептозотоциновий діабет*

Інсуліннезалежна форма цукрового діабету розвивається у 2-місячних щурів Вістар, яким в неонатальному віці було введено стрептозотонин. Використовується два варіанти індукції неонатального стрептозотоцинового діабету у щурів Вістар: а) внутрішньоочеревинне одноразове введення стрептозотонину на другу добу після народження (100 мг/кг); б) внутрішньоочеревинне введення стрептозотонину 5-добовим щурят (80 мг/кг). Стрептозотонин, як і в попередніх випадках, розчиняють у цитратному буфері (рН-4,5). Контрольні тварини отримують аналогічний об'єм цитратного буферу. На 28-му добу після народження щурят відсаджують від матері. При введенні стрептозотонину на п'яту добу після народження протягом найближчих 3 діб відмічається висока смертність (у середньому до 50%), що необхідно враховувати при формуванні груп тварин для дослідження цукрознижуючих сполук.

У щурів, яким вводять стрептозотонин в 2-добовому віці, через 3–5 діб розвивається гострий інсулідефіцитний діабет: високий рівень глюкози в плазмі, знижений вміст інсуліну в підшлунковій залозі, низька інсулінемія, високий рівень глюкагону в плазмі при незмінному його рівні в підшлунковій залозі. Смертність складає менше 30%. Завдяки швидкій спонтанній ремісії, яка супроводжується регенерацією бета-клітин та накопиченням запасів інсуліну в підшлунковій залозі, поступово нормалізується глікемія та інсулінемія. В 3–4 тижневому віці маса тіла та базальна глікемія у щурів, яким було введено стрептозотонин в неонатальному віці, не відрізнялися від показників в інтактному контролі. Але, починаючи з 8-тижневого віку, у цих тварин відмічається помірна базальна гіперглікемія, порушена толерантність до глюкози. При цьому спостерігається 50% зменшення вмісту інсуліну в підшлунковій залозі без зміни концентрації глюкагону. Крім того відмічається суттєво знижена (майже до відсутності) секреторна реакція бета клітин на глюкозу при збереженні реакції на неглюкозні секретогени.

Більш важкий варіант патології розвивається в випадку обробки стрептозотонином 5-добових щурят: після короткочасного синдрому гострого дефіциту інсуліну для них характерним є розвиток виразної базальної гіперглікемії та глюкозної інтолерантності, підвищення глікозильованого гемоглобіну, різке зменшення вмісту панкреатичного інсуліну, розвиток інсулінової резистентності. При цьому початок гіперглікемії та зниження інсулінової реакції у відповідь на підвищений рівень глюкози в плазмі спостерігається вже в 4-тижневому віці.

Виразність інсуліннезалежного цукрового діабету у дорослих щурів після введення стрептозотонину в неонатальному віці, крім віку тварин на момент обробки стрептозотонином, також залежить від лінії щурів, на якій проводиться дослід. Так, у самиць щурів Sprague-Dawley, яким вводили стрептозотонин у 2-добовому віці (90 мг/кг), важкість діабету була подібною до діабету у щурів лінії Вістар після введення стрептозотонину (80 мг/кг) на 5-добу після народження. Крім того виразність діабету, що моделюється, залежить від дієти. Наприклад, їжа з високим вмістом ліпідів погіршує стан глюкозного гомеостазу. Стать тварин, по меншій мірі в першому варіанті даної форми діабету, не впливає на виразність гіперглікемії в дорослому стані [22].

Таким чином, вищенаведена модель інсуліннезалежного цукрового діабету забезпечує чудову можливість для характеристики цукрознижуючої дії біологічно активних сполук, особливо при їх тривалому використанні. Наявність у діабетичних щурів специфічної недостатності секреторної інсулінової відповіді на глюкозу за умов збереження реакції на інші секретогени, подібна до порушень реакції панкреатичних бета-клітин у хворих на цукровий діабет 2 типу.

### *Стрептозотоциновий діабет з одночасним введенням нікотинаміду*

В основі створення нової моделі інсуліннезалежного цукрового діабету лежить частковий захист панкреатичних бета-клітин від цитотоксичної дії стрептозотоцину за допомогою відповідних доз нікотинаміду. Введення нікотинаміду в дозі 230 мг/кг маси тіла інтраперитонеально 3-місячним щурам Вістар за 15 хвилин до внутрішньовенної ін'єкції стрептозотоцину (65 мг/кг) призводить до помірної та стабільної базальної гіперглікемії та 40% збереження запасів панкреатичного інсуліну. Вищезначена модель характеризується інтолерантністю до вуглеводів, відносною недостатністю секреції інсуліну у відповідь на підвищений рівень глюкози та збереженням секреторної реакції на не глюкозні секретогени (в тому числі, на сульфаниламідні препарати).

Встановлено, що зв'язування інсуліну з мембранами клітин печінки за умов даної моделі прогресивно знижується, починаючи з 15 доби після індукції діабету та досягає максимуму через 60 діб від початку експерименту, що призводить до розвитку вторинної інсулінорезистентності [23].

Таким чином, дана модель дозволяє відтворити головні патогенетичні ознаки цукрового діабету 2 типу у людини, а саме – порушення секреції та дії інсуліну і має певні переваги для дослідження цукрознижуючого ефекту нових препаратів з різним механізмом дії.

### *Дексаметазоновий діабет*

Відомо, що надмірні дози глюкокортикоїдів можуть призводити до порушень секреторної функції панкреатичних бета-клітин та розвитку інсулінорезистентності. Підшкірне введення дексаметазону (0,125 мг/кг) протягом 13 діб 18-місячним щурам Вістар призводить до помірної базальної гіперглікемії, дворазового зростання концентрації інсуліну та неетерифікованих жирних кислот в сироватці крові експериментальних тварин. Крім того, у них відмічається погіршення толерантності до вуглеводів та зниження чутливості периферичних тканин до дії інсуліну [24].

Механізм розвитку патологічних процесів, індукованих дексаметазоном, ще до кінця не з'ясований. Відомо, що обробка дексаметазоном підвищує продукцію острівцевого амілоїдного поліпептиду – амліну, гормону, що синтезується панкреатичними бета-клітинами і є головною складовою частиною острівцевого амілоїду, який утворюється у пацієнтів, хворих на цукровий діабет 2 типу. Фізіологічне значення амліну остаточно ще не з'ясовано, але його супресивний ефект щодо дії інсуліну в скелетних м'язах, печінці та гальмування секреції інсуліну в поєднанні з амілоїдогенними властивостями свідчать про можливу роль цього гормону в патогенезі інсуліннезалежного цукрового діабету [25]. В останні роки було показано, що зниження утилізації глюкози адипоцитами після ін'єкції дексаметазону є наслідком його прямого впливу на експресію транспортерів глюкози GLUT1 та GLUT4, що призводить до розвитку інсулінорезистентності [26].

У той же час, гальмуючий ефект глюкокортикоїдів на секреторну активність панкреатичних бета-клітин, можливо, пов'язаний з інактивацією мітохондріальної ФАД-гліцерофосфатдегідрогенази – ферменту, який відіграє ключову роль в секреції інсуліну, індукованій глюкозою [27].

Таким чином, дексаметазоновий діабет у старих щурів дозволяє відтворити головні патогенетичні механізми (порушення секреції та дії інсуліну), що спостерігаються у хворих на цукровий діабет 2 типу.

Введення дексаметазону за аналогічною схемою 3-місячним щурам Вістар також призводить до розвитку інтолерантності до глюкози, інсулінорезистентності та гіперінсулінемії, але на відміну від старих щурів не викликає змін в базальній глікемії, тобто відтворює стан предіабету.

Другий варіант дексаметазонової моделі доцільно використовувати для дослідження нових цукрознижуючих препаратів, механізм дії яких полягає в поліпшенні толерантності до вуглеводів та чутливості периферичних тканин до дії інсуліну (бігуаніди, тiazолідиндіони та інші).

## 4. Генетично детерміновані форми цукрового діабету

### *Інсулінзалежний цукровий діабет*

#### *Миші NOD (non-obese diabetic mouse)*

*Походження.* Інбредна лінія мишей NOD отримана шляхом селективного розведення мишей ICR протягом 1974–1980 рр. в Aburahi Laboratories, Shionogi and Co, Osaka, Japan, Dr. Y. Tochino.

*Характеристика патології.* Інсулінзалежний цукровий діабет розвивається спонтанно на 12–13 тиждень життя. Момент маніфестації характеризується полідипсією, глюкозурією, швидкою втратою маси тіла, гіперглікемією та кетоацидозом. Перед тим як з'являється гіперглікемія, розвивається інсуліт (лімфоцитарна інфільтрація панкреатичних острівців), прогресуюча деструкція бета-клітин та зниження рівня інсуліну в плазмі крові, що призводить до формування інсулінової залежності. Без введення екзогенного інсуліну тварини гинуть протягом 4–8 тижнів. Клінічні, морфологічні та імунологічні характеристики у мишей NOD дуже подібні до цукрового діабету 1 типу у людини. Так само, як і у людей, спостерігається тривалий латентний період, що зручно для дослідження не тільки цукрознижуючих препаратів, але й для вивчення антидіабетичних препаратів, які запобігають або гальмують автоімунну деструкцію панкреатичних бета-клітин та стимулюють регенерацію останніх.

На відміну від цукрового діабету 1 типу у людини, для мишей NOD характерна одночасна інфільтрація інших залоз та органів (слинна, щитовидна та надниркові залози), а також виразний статевий диморфізм розвитку діабетичного синдрому (маніфестаційний діабет розвивається у 70–80% самиць та у 10–20% самців, при цьому важкість інсулітів у них однакова). Частоту маніфестації діабету можна підвищити до 100% шляхом внутрішньоочеревинного введення тваринам в 20-добовому віці стрептозотоцину (20 мг/кг щодобово протягом 5 діб) [28].

*Галузь застосування.* Дослідження сполук з можливим гіпоглікемічним та імунокоригуючим ефектом (підвищення інсулінової забезпеченості організму та гальмування автоімунної деструкції панкреатичних бета-клітин), а також спрямованих на посилення регенерації інсулінпродукуючих клітин.

*Утримання.* Гнотобіотичні умови.

#### *Щури BB*

*Походження.* Тварини виявлені у 1974 р. у Bio Breeding Laboratories of Canada, Ottawa серед щурів популяції Вістар, які утримувалися за ВПФ-умов.

*Характеристика патології.* Інсулінзалежний цукровий діабет у щурів BB характеризується гіпоінсулінемією, гіперглікемією, полідипсією, поліурією, кетонурією. Частота діабету в базовій колонії коливалась в межах від 0 до 50% (в середньому 8%). Останніми роками шляхом селекції отримані щури, у яких частота діабету на 120 добу від народження складає 25–59%, а у щурів частково інбредної колонії (BB/w) – близько 70%. Гіперглікемія розвивається з однаковою частотою у самців та самиць. Початок захворювання, як правило, гострий та тяжкий, характеризується виразною інфільтрацією навколо острівців та в їх середині (інсуліт) із швидкою втратою панкреатичних бета-клітин, лімфоцитарним тиреоїдитом (до 50% тварин) без порушень функції щитовидної залози. Більшості для підтримання життя необхідні постійні ін'єкції інсуліну (нестабільна форма), деякі можуть тривало обходитися без інсулінотерапії (стабільна форма).

У щурів з маніфестаційним інсулінзалежним цукровим діабетом спостерігається селективне порушення секреції інсуліну, індукованої глюкозою. Втрата чутливості до глюкози притаманна також альфа- та дельта-клітинам. Результатом тяжкого дефіциту інсуліну є підвищений глюконеогенез та глікогеноліз в печінці. В крові підвищується концентрація вільних жирних кислот та тригліцеридів, загальний вміст в організмі жирів та білків знижується. Для діа-

бету у щурів ВВ характерне швидке прогресування від норми до глибокої метаболічної декомпенсації протягом кількох діб та без інсулінотерапії – загибель внаслідок кетоацидозу. Існують докази автоімунного генезу діабетичного синдрому у щурів ВВ (панкреатичний інсуліт передуює маніфестації захворювання, можливий адаптивний перебіг діабету, а також запобігання клінічних ознак захворювання, як і морфологічних порушень, за допомогою імуносупресивної та імуномодулюючої терапії) [29].

Діабетичні щури ВВ, разом з мишами NOD, є одними з кращих моделей інсулінзалежного цукрового діабету автоімунного генезу (цукровий діабет 1 типу у людини).

*Галузь застосування.* Дослідження сполук з можливим гіпоглікемічним, імунокорегуючим та стимулюючим регенерацію інсулін-продукуючих клітин ефектом. На стадії маніфестації захворювання вони є зручною моделлю для вивчення патогенезу та терапії діабетичних ангіопатій та поліендокринопатій.

*Утримання.* ВПФ-умови.

### **Інсуліннезалежний цукровий діабет**

#### *Миші з ожирінням C57Bl/KsJ- db/db*

*Походження.* Аутосомно-рецесивна мутація гену db(diabetes) виявлена у мишей інбредної лінії C57Bl/KsJ 1965 р. у Jackson Laboratory, USA.

*Характеристика патології.* У гомозигот за геном db (восьма група зчепності, четверта хромосома) розвивається ожиріння після підсосного періоду. Діабетичному синдрому притаманна гіперфагія, полідипсія, поліурія, гіперглікемія, тимчасова гіперінсулінемія, гіперглюкоземія та прогресуюча інсулінова резистентність. У 5–8 місячному віці у тварин спостерігається виразний некроз панкреатичних бета-клітин, інсулінопенія, різко наростаюча гіперглікемія. Протягом декількох тижнів зменшується маса тіла і тварина помирає. Навколо острівців спостерігається накопичення еозинофільних гранулоцитів та фібробластів. У бета-клітинах цих мишей виявлені вірусоподібні частки. Зменшення маси бета-клітин та нездатність їх до проліферації зумовлюють загибель мишей, але до теперішнього часу механізми деструкції бета-клітин зостаються нез'ясованими.

У мишей даної лінії виявлена підвищена чутливість до інфекції, знижена здатність відторгати аlogenні транспланти та розвивати цитотоксичні відповіді Т-клітин після сенсibilізації *in vivo*. Спостерігається рання інволюція тимусу, розвиток Т-лімфоцитопенії з дисбалансом субпопуляції Т-клітин. Більшість з цих феноменів є вторинними до метаболічних порушень (гіперінсулінемія, хронічна гіперглікемія, гіперліпідемія) [30].

Ген db/db діє самостійно як діабетогенний стрес, викликаючи інсулінову залежність. Сила відповіді на цей стрес залежить від генетичного фону, на якому експресується ген db/db та від дієти. Так, на відміну від діабет-чутливої інбредної лінії C57Bl/KsJ, тварини інбредної лінії C57Bl/6J резистентні до гену db/db, що індукує діабет. У них експресія цього гену характеризується гіперплазією панкреатичних бета-клітин та гіперінсулінемією, достатньою для компенсації діабетогенного стресу (у цих мутантних мишей розвивається ожиріння без діабету).

*Галузь застосування.* Чітка тривалість діабетогенезу у мишей C57Bl/KsJ-db/db дозволяє використовувати цю модель для характеристики цукрознижуючої дії нових сполук, а також речовин з позитивним впливом на регенерацію панкреатичних бета-клітин на різних стадіях патологічного процесу (інтолерантність до глюкози, маніфестаційний інсуліннезалежний та маніфестаційний інсулінзалежний діабет). Крім того, цю модель можна використовувати для коректної оцінки ефекту тривалої терапії новими антидіабетичними сполуками на спонтанну еволюцію інсулінової залежності, а саме для вирішення питання про її стимулюючий або гальмуючий вплив на розвиток абсолютної інсулінової недостатності.

Останніми роками були розроблені також інші спадкові моделі інсулін-незалежного цукрового діабету (діабет без ожиріння у щурів Goto-Kakizaki та діабет з ожирінням у щурів Otsu-

ka Long-Evans Tokushima Fatty – OLEFT), які застосовують для вивчення нових фармакологічних препаратів, спрямованих на лікування цукрового діабету 2 типу [31, 32].

Слід зазначити, що спектр існуючих на сьогодні генетично детермінованих моделей інсулінової недостатності не обмежується тими формами, що були наведені вище. Їх кількість постійно зростає, але ще не всі вони достатньо вивчені та мають певні переваги у відтворенні головних патогенетичних механізмів цукрового діабету 1 та 2 типу у людини.

Слід наголосити, що вибір конкретної експериментальної моделі (хімічно індукованої або генетично детермінованої) та параметрів, які оцінюються, в кожному випадку визначається з урахуванням передбачуваного механізму цукрознижуючої дії нової сполуки, що вивчається. При розробці нових антидіабетичних засобів необхідно звернути увагу на тенденцію до збільшення кількості показників, які підлягають оцінці, окрім характеристики гіпоглікемічного ефекту. Вона базується на отриманих останніми роками даних про ангіопротекторні властивості цукрознижуючих препаратів, їх антиоксидантний ефект, позитивний вплив на ліпідний профіль та стан серцево-судинної системи.

Така комплексна оцінка антидіабетичних ефектів нових біологічно активних сполук із застосуванням гетерогенних моделей інсулінової недостатності надає можливість для обґрунтованої екстраполяції отриманих результатів доклінічного вивчення на хворих цукровим діабетом, що сприятиме ефективному впровадженню фармакологічних розробок у клінічну практику.

## Література

1. Горбенко Н.И. Современные аспекты фармакологической коррекции гипергликемии у больных инсулиннезависимым сахарным диабетом (тип 2)//Эксперим. и клин. фармакол.– 1999.– Т.62, №5.– С. 71- 78.
2. Полторак В.В., Горбенко Н.И. Сучасна концепція пероральної фармакотерапії цукрового діабету та його судинних ускладнень//Клін. фармація.–1999.–Т.3, № 2.–С. 31–41.
3. Buse J. Combining insulin and oral agents//Am. J. Med.– 2000.– V.108 (6A), №4.– P. 23S–32S.
4. Полторак В.В. Методические рекомендации по экспериментальному изучению новых пероральных гипогликемических средств/К.: Фарм. комитет МЗ Украины, 1996.– 28 с.
5. Галлер Г., Штрауценберг С. Пероральная терапия диабета.– М.: Медицина, 1973.– 343 с.
6. Barman J.A., Plosker G.L. Rosiglitazone//Drugs.– 1999.– V.57, №6.– P. 921–930.
7. Цюхно З.И., Славнов В.Н., Панченко Н.И. и др. Функциональные методы исследования в эндокринологии. - К.: Здоров'я, 1981.– 240 с.
8. Янкевич Д.Е. Факторы, влияющие на реактивность животного организма к инсулину: Автореф. дис. ... д-ра мед. наук.– Харьков, 1962.– 33 с.
9. Von Aumuller W., Bander A., Heerdt R. et al. Ein neues hochwirksames Orales Anti-diabeticum//Arzneim. Forsch.– 1966.– Bd.16, №12.– S. 1640–1641.
10. Preiffer E.F. Are the «second generation» oral hypoglycemic agents really different?//Acta Diabetol. Lat.– 1966.– V.21, №1.– P. 1–32.
11. Parker K.M., England J.D., Da Costa J. et al. Improved colorimetric assay for glycosylated hemoglobin//Clin. Chem.– 1981.– V.27, №5.– P. 669–672.
12. Matthews D.R., Hosker J.P., Rudenski A.S. et al. Homeostasis model assessment: insulin resistance and  $\beta$ -cell function from fasting plasma glucose and insulin//Diabetol.– 1985.– V.28.– P. 412–419.
13. Akinmokun A., Selby P.L., Ramaiya K., Alberti K.G.M.M. The short insulin tolerance test for determination of insulin sensitivity: a comparison with the euglycaemic clamp//Diab. Med.– 1992.– V.9.– P. 432–437.
14. Lenzen S., Panten U. Alloxan: history and mechanism of action//Diabetol.–1988.– V.31.– P. 337–342.

15. Malaissi M.J. Alloxan toxicity to the pancreatic b-cell//Biochem. Pharmacol.– 1982.– V.31.– P. 3527–3534.
16. Boquist L. A new hypothesis for alloxan diabetes//Acta Pathol. Microbiol. Scand.– 1980.– V. 88.– P. 201–209.
17. Rakieta N., Rakieta M.L., Nadkarni M.V. Studies on the diabetogenic actions of streptozotocin (NSC37919)//Cancer Chemother. Rep.– 1963.– V.29.– P. 91–98.
18. Yamamoto H., Uchigata Y., Okamoto H. Streptozotocin and alloxan induce DNA strand breaks and poly(ADP-ribose) synthetase in pancreatic islets//Nature.–1981.– V. 294.– P. 284–286.
19. Полторак В.В., Блох К.О. Стрептозотоциновий і вірусний інсулін-зависимий сахарний діабет (аутоімунні аспекти)//Пробл. ендокринолог.– 1989.– Т.35, №3.– С. 81–88.
20. Like A.A., Rossini A.A. Streptozotocin-induced pancreatic insulinitis: A new model of diabetes mellitus//Sci.– 1976.– V.193.– P. 415–417.
21. Okamoto H. Regulation of proinsulin synthesis in pancreatic islets and a new aspect to insulin-dependent diabetes//Mol. Cell Biochem.– 1981.– V.3.– P. 43–61.
22. Portha B., Kergoat M. Dynamic of glucose-induced insulin release during the spontaneous remission of streptozotocin diabetes induced in the newborn rat//Diab.– 1985.– V.34.– P. 547–579.
23. Masiello P., Broca C., Gross R. et al. Development of a new model in adult rats administered streptozotocin and nicotinamide//Diab.– 1998.– V.47.– P. 224–229.
24. Novelli M., Barbera M., Fierabracci V. et al. Effect of the age and dexamethasone treatment on insulin secretion from isolated perfused rat pancreas//Diabetol.– 1996.– Suppl.1.– P. A124.
25. Mulder H., Ahren B., Stridsberg M., Sundler F. Non-parallelism of islet amyloid polypeptide (amylin) and insulin gene expression in rats islet following dexamethasone treatment//Diabetol.– 1995.– V.4.– P. 395–402.
26. Buren J., Eriksson J. Dexamethasone decreases GLUT 1 and GLUT 4 content in primary cultured rat adipocytes//Diabetol.– 1999.– V.42 (Suppl. 1).– P. A170.
27. Fabregat M., Fernandez-Alvarez J., Franco C. et al. Dexamethasone-induced changes in FAD-glycerophosphate dehydrogenase expression in human pancreatic islets//Diabetol.– 1999.– V.42 (Suppl. 1).– P. A141.
28. Toyota T., Kataoka S., Sato J. et al. Islet cell antibody and immunologic aspects of NOD mice//Clinico-genetic genesis of diabetes mellitus/G.Mimura, S.Baba, Y.Goto, J.Kobberling, eds.//Excerpta Med.– 1982.– V.597.– P. 185–192.
29. Полторак В.В., Блох К.О. Аутоімунний генез інсулін-зависимого сахарного діабета на моделі крыс ВВ//Иммунолог.– 1989.– №3.– С. 5–10.
30. Leiter E.H., Prochazka M., Shultz L.D. Effect of immunodeficiency on diabetogenesis in genetically diabetic (db/db) mice//J. Immunol.– 1987.– V.138.–P. 3224–3229.
31. Goto Y., Kakizaki M., Masaki N. Spontaneous diabetes produced by selective breeding of normal Wistar rats//Proc. Jpn. Acad.– 1975.– V.51.– P. 80–85.
32. Kawano K., Hirashima T., Mori S. et al. A new rat strain with non-insulin dependent diabetes mellitus, «OLITF»//Rat. News Lett.– 1991.– V.25.– P. 24–25.



## ДОКЛІНІЧНЕ ВИВЧЕННЯ ТИРОСТАТИЧНИХ ТА ТИРОЇДСТИМУЛЮЮЧИХ ЗАСОБІВ

Ром-Богуславська О.С., Божко Т.С., Комарова І.В.,  
Ладогубець О.В., Пивоваревич Л.П., Яременко Ф.Г.,  
Лсгонькова І.Ю.

### Вступ

Велике поширення тиропатій, а також відсутність достатньо ефективних методів терапії робить необхідним пошук нових засобів для лікування захворювань щитоподібної залози (ЩЗ). Особливого значення набуває розробка чітких методичних рекомендацій з фармакологічної оцінки специфічної активності як тиростатичних, так і тироїдстимулюючих засобів.

В основу методичних рекомендацій, що пропонуються, покладені рекомендації з доклінічного вивчення тиростатичних та тироїдстимулюючих засобів [1], вимоги нормативних документів (Правила доклінічної оцінки безпеки фармакологічних засобів (GLP), Переліки зареєстрованих в Україні лікарських засобів [2], а також досвід роботи Інституту проблем ендокринної патології ім. В.Я.Данилевського та інших провідних інститутів України.

Метою створення даних методичних рекомендацій є уніфікація підходів до оцінки специфічної активності анти- та протироїдної дії сполук з використанням стандартизованих експериментальних моделей, що дозволить на сучасному рівні а також більш об'єктивно оцінити ефект засобів, що досліджуються (ДЗ), та оптимізувати рекомендації з їхнього клінічного застосування.

Експериментальне вивчення специфічної дії анти- та протироїдної дії повинно складатися з трьох етапів:

1. Первинний скринінг на інтактних тваринах.
2. Фармакотерапевтичне вивчення на експериментальних моделях.
3. Біотестування за умов *in vitro* на отриманій субопераційно ЩЗ хворих на тиропатії.

Фармакотерапевтичне вивчення анти- та протироїдної дії ДЗ рекомендується проводити не менш, ніж на двох експериментальних моделях різного генезу.

Такий комплекс досліджень дозволяє оцінити вплив ДЗ на функціональний стан ЩЗ у нормі та при патології і є базовою основою для подальшого поглибленого вивчення механізмів їхньої дії.

### 1. Відбір об'єкту дослідження

Дослідження анти- та протироїдної активності фармакологічних засобів проводиться на таких тваринах: білих щурах популяції Вістар з масою тіла 50–60 г, 180–240 г та на кролях породи Шиншила з масою тіла 2000–3000 г. Розбіжність в експериментальній групі за вихідною масою не повинна перевищувати 10%.

Скринінгові дослідження проводяться на самцях (для виключення впливу естрального циклу), але, у зв'язку з тим, що чутливість до одного й того ж ДЗ у самців і самиць може бути різною, в досліджах на експериментальних моделях тиропатій рекомендується використання тварин обох статей. У скринінгових дослідженнях вивчення речовин проводиться в широкому діапазоні доз, вибір яких залежить, в основному, від хімічної природи сполук. Для оцінки їхньої фармакотерапевтичної активності слід використовувати не менше двох доз, з яких мінімаль-

на є близькою до рекомендованої для клінічного випробування терапевтичної дози (1 ДТ), максимальна – на порядок вища (10 ДТ), але не виходить з інтервалу широти терапевтичної дії лікарського засобу.

У кожній експериментальній групі повинно бути не менше 10 тварин. Їх належить утримувати в оптимальних умовах віварію з забезпеченням температурного (за винятком експериментальних температурних умов) та світлового режимів, повноцінного харчування, захисту від інфікування. Оскільки функціональна активність ЩЗ безпосередньо залежить від надходження до організму ендogenous йоду, для уніфікації умов утримання рекомендується до початку введення сполук, що тестуються, витримати тварин протягом 20 діб на дієті зі стандартною, чітко визначеною кількістю йоду – з розрахунку 5,0–5,5 мкг/100 г маси тіла тварини [3].

## 2. Вивчення специфічної активності тиростатичних засобів в експериментах *in vivo* та *in vitro*

### 2.1. Первинний відбір потенційних тиростатичних засобів

Для проведення скринінгу нових сполук з передбачуваною тиростатичною дією рекомендується використання стандартного методу «зобної» реакції, що базується на компенсаторному збільшенні щитоподібної залози під впливом тиростатиків [4]. Експеримент проводять на щурах-самцях популяції Вістар масою 50–60 г. Сполуки, що випробовуються, додають тваринам у корм з таким розрахунком, щоб він поїдався щурятами протягом 22–24 годин без залишку, та, тим самим, забезпечувалася постійна концентрація ДЗ в організмі. Як препарат порівняння використовується тіамазол (мерказоліл) в ефективній дозі, що дорівнює 10 мг/кг маси тіла, яка викликає максимальне зниження рівня тироїдних гормонів у сироватці крові (до 50–70%). Контрольну групу складають інтактні тварини, що знаходяться в аналогічних умовах. Кожні 2–3 дні (для уточнення дозування ДЗ), а також наприкінці експерименту визначають масу тіла у всіх тварин. Тривалість експерименту – 10 днів. На 11-й день тварин виводять з експерименту шляхом миттєвого перерізування спинного мозку біля основи черепа під ефірним наркозом. Кров збирають, центрифугують та визначають у сироватці рівень  $T_3$ ,  $T_4$  та ТТГ за допомогою радіоімунологічних або імуноферментних наборів.

Щитоподібну залозу вилучають та проводять визначення її абсолютної ( $M_{абс}$ ) та відносної ( $M_{відн}$ ) маси.  $M_{абс}$  визначається зважуванням,  $M_{відн}$  підраховується за формулою:

$$M_{відн} = \frac{M_{абс}}{M_{тіла\ тварини}} \cdot 10^4$$

Для оцінки змін мікроструктури ЩЗ фіксують в рідині Карнуа та, для отримання максимально тонких зрізів, заливають у целоїдин-парафін. Гістологічні зрізи забарвлюють гематоксилін-еозином або за Маллорі [5, 6]. Функціональний стан щитоподібної залози оцінюють за висотою фолікулярного епітелію та діаметру фолікулів, що визначають за допомогою окуляр-мікрометра: в 50 фолікулах вимірюють великий та малий діаметр (вираховується середній діаметр фолікулу), а також висоту епітеліальних клітин (по 2–3 клітини з протилежних боків фолікулу) [7, 8].

У інтактних тварин значення показників, що досліджувалися, встановлені в наших експериментах та за даними ряду авторів [7–13], складають:

$M_{абс}$  – 5,0–10 мг

$M_{відн}$  – 1,05–2,50

діаметр фолікулу (d мкм) – 38,6–42,3

висота епітеліальної клітини (h мкм) – 6,3–9,1

$T_3$  – 1,2–3,0 нмоль/л

$T_4$  – 52,0–120 нмоль/л

ТТГ – 0,4–1,6 мМОд/л

## 2.2. Вивчення тиростатичних засобів на експериментальних моделях

Метою виявлення у скринінгових дослідженнях сполук з високою антитироїдною активністю є створення на їхній основі потенційних тиростатичних препаратів для лікування тиропатій.

Подальше вивчення специфічної активності сполук, що випробовуються, вимагає проведення досліджень на тваринах, у яких моделюється стан гіпертирозу. На жаль, до цього часу не існує адекватної моделі дифузного токсичного зобу (ДТЗ) у експериментальних тварин з причин його складного, у першу чергу, автоімунного генезу.

Для більш детального та всебічного вивчення антитироїдної активності ДЗ рекомендується дослідження його специфічних властивостей на кількох моделях гіпертирозу, які дозволять характеризувати різні аспекти його дії.

### 2.2.1. Модель холодового гіпертирозу

Однією з найважливіших функцій тироїдних гормонів в організмі є їхня активна участь у процесі терморегуляції. Безпосередня стимуляція тироїдними гормонами швидкості метаболічних процесів, поглинання кисню тканинами призводить до посилення теплоутворення [14], що особливо демонстративно під дією низьких температур [15]. На основі цих адаптивних механізмів і створено модель гіпертирозу, а саме: щурів з масою тіла 150–200 г утримують при зниженій температурі – близько  $+5^{\circ}\text{C}$  протягом 5 діб [16]. У подальшому, на фоні холодового стресу протягом 10 днів вводять ДЗ та препарат порівняння (у більшості випадків – похідні імідазолу). Після закінчення експерименту співставляються показники вмісту тироїдних гормонів та ТТГ у сироватці крові експериментальних щурів усіх серій та інтактних щурів. Проводиться також співставлення показників гісто-морфологічних та морфометричних досліджень ЩЗ всіх груп тварин.

За даними літератури, дія низьких температур призводить до гіперфункції ЩЗ шляхом активації центральних регуляторних механізмів – вже за 30 хвилин виявляється підвищення рівня ТТГ [17]. Цей процес частково може бути ініційовано посиленням секреції (але не синтезу) тироліберину гіпоталамусом [18]. Більш тривала холодова експозиція призводить до подальшої активації функціонального стану вже всієї гіпофізарно-тироїдної системи, що підтверджується як даними вмісту тироїдних гормонів, так і змінами морфоструктури ЩЗ, характерними для її «збудження» [13]. Під час впливу низьких температур у периферичній крові піддослідних тварин відзначається зсув співвідношення  $T_3/T_4$  у бік зростання частки більш активної форми – трийодтироніну. Подібні зміни співвідношення тироїдних гормонів спостерігаються й безпосередньо в тканині ЩЗ [13].

Слід, однак, зазначити, що ця реакція є відносно короткочасною, та з часом відбувається адаптація до нових температурних умов. Але, оскільки випробування сполук з антитироїдною активністю проводиться протягом 10–14 днів, дана модель є досить коректною та інформативною для подібного роду досліджень.

У літературі зустрічається опис робіт, проведених в умовах більш екстремального охолодження тварин. З нашої точки зору, подібна модель холодового стресу менш придатна з цілої низки причин: по-перше, довготривала експозиція при мінусових температурах підвищує вірогідність важких застудних захворювань, по-друге, такі умови спричиняють порушення фізіологічної адаптації тварин до екстремальних ситуацій [13, 19].

### 2.2.2. Модель тиротропної стимуляції щитоподібної залози

Відомо, що тиротропін є потужним специфічним стимулятором функції ЩЗ, дія якого реалізується через систему аденілатциклаза-цАМФ. Його основний гострий ефект зводиться до стимуляції продукції та секреції тироїдних гормонів, а хронічний – до гіпертрофії та гіперплазії ЩЗ [20]. У ряді випадків показано, що навіть одноразова ін'єкція ТТГ призводить до трива-

лого (до кількох діб) підвищення вмісту тироїдних гормонів у крові піддослідних тварин [21]. До того ж, у багатьох випадках при тиротропній стимуляції зростання вмісту  $T_3$  у крові та безпосередньо у ЩЗ носить більш стабільний та тривалий характер; індекс  $T_3/T_4$  у таких тварин вірогідно перевищує контрольні значення [21–24].

Для розвитку стану ТТГ-стимульованого гіпертирозу експериментальним тваринам вводять препарат ТТГ у дозі 0,5–1,0 Од/кг маси тіла, або ж 1,0–1,5 мкг/кг маси тіла [21] парентерально (підшкірно або внутрішньочеревинно) протягом 10 днів. У дослідних серіях на фоні стимулювання ТТГ проводять введення ДЗ та препарату порівняння. Інтактним тваринам вводять фізіологічний розчин та плацебо.

Ефективність ДЗ та стандартного препарату порівняння визначається за ступенем нівелювання змін, що викликані введенням ТТГ. Такими критеріями ефективності є показники вмісту тироїдних гормонів у сироватці крові та результати гістологічного дослідження ЩЗ у тварин. Введення екзогенного ТТГ підвищує рівень  $T_3$ ,  $T_4$  в крові та призводить до морфологічних змін у ЩЗ. Нормальна гістроструктура ЩЗ репрезентована по периферії фолікулами середнього та великого калібру, заповненими щільним, місцями з крайовою вакуолізацією, колоїдом; стінки порожнини фолікула вистлані кубічним або щільним кубічним епітелієм. У тироцитах ядро центрально розташоване, круглої або овальної форми, нормохромне. Розподіл хроматину в ядрі дифузний. Висота тироцитів коливається: найбільш високі – в центрі залози, низькі – по периферії. При введенні ТТГ [25] зменшується розмір тироїдних фолікулів, вони заповнюються пінистим вакуолізованим колоїдом. Спостерігається велика кількість мікрофолікулів, які містять краплі колоїду. Тироцити кубічної форми, мають базально розміщені круглі гіпохромні ядра. Цитоплазма піниста, більш інтенсивно сприймає еозин на апікальній поверхні, іноді в цитоплазмі зустрічається зернистість, вакуолі. Можуть бути присутні осередки дистрофічних змін.

Аналогічні зміни, що свідчать про збільшення функціональної активності тироїдної паренхіми, відзначаються й при інших видах стимуляції ЩЗ – холодовий стрес [13], парціальна тироїдектомія [26].

Хоча за даними деяких авторів при повторному введенні ТТГ його ефект на секрецію тироїдних гормонів не знижується та не розвивається рефрактерність до нього, більшість дослідників відзначає відносну нетривалість фази гострої відповіді ЩЗ на тиротропну стимуляцію [27–29]. Отже, незалежно від механізмів розвитку зниження реактивності ЩЗ на тиротропну стимуляцію, тривалість введення ТТГ експериментальним тваринам не повинна перевищувати 10–14 днів.

### 2.2.3. Модель парціальної тироїдектомії

Видалення однієї частки щитоподібної залози (гемітироїдектомія) супроводжується компенсаторною гіперфункцією залишеної частки [26, 30, 31]. Слід враховувати, що в перші дні після операції в зв'язку з тим, що під час операції в кров потрапляє велика кількість тироїдних гормонів, вміст  $T_3$  та  $T_4$  може транзиторно підвищуватись, але надалі знижується поряд з підвищенням рівню ТТГ та тироліберину (ТРГ) [31]. У той же час, при гістологічному дослідженні у ЩЗ у цей період виявляються виразні ознаки гіперфункції [32]. У зв'язку з вищезазначеним, головним критерієм ефективності тиростатичних засобів є зміна структури залози, а динаміка вмісту тироїдних гормонів у крові має суттєво менше значення.

Тиростатичні препарати (ДЗ та препарат порівняння) призначають з 6-го дня з моменту операції в прийнятних дозах, результати враховують за 3 тижні після операції. Оскільки чутливість залишеної після геміструмектомії частки ЩЗ до тиротропних впливів значно зростає [33, 34], можливе використання комбінованої моделі парціальної тироїдектомії з наступним введенням ТТГ. Тиротропний гормон належить вводити протягом 5 днів з моменту операції в дозі 0,5 Од/кг маси тіла. Облік реакції, як і в попередньому разі, робиться за 3 тижні після операції.

#### 2.2.4. Модель стимуляції щитоподібної залози тироліберином

Протягом останніх років в УкрНДІФЕЗ була відпрацьована та широко використовувалась модель стимуляції тироїдної функції експериментальних тварин (щурів та кролів) тироліберином.

Під час відпрацювання даної моделі виходили з припущення, що, поряд з трансгіпофізарною стимуляцією тироїдної функції, ТРГ має місце також і самостійний вплив на паренхіму ЩЗ. На можливість подібних ефектів тироліберину вказують роботи низки дослідників [35–38].

Для розвитку стану гіпертирозу використовуються препарати синтетичного ТРГ. У наших дослідженнях вживався «Рифатироїн» (Латвія) та препарат «Relefact TRH nasal» («Ночхст», Німеччина). У першому випадку ТРГ вводився інтактним щурам з масою тіла 150–180 г внутрішньом'язово в дозі 20 мкг/кг маси тіла (або 1 мОд/100 г маси тіла). У другому випадку – інтактним самцям кролів породи Шиншила масою 2,0–2,5 кг у дозі 25 мкг/кг маси тіла інтраназально. В обох випадках тварини оброблялись ТРГ щоденно протягом усього експерименту – 15 діб. ДЗ починали давати з 6-го дня на фоні введення ТРГ. Ефективна доза ТРГ, яку використовують для стимуляції тироїдної функції, в значній мірі залежить від способу його введення: за ступенем ефективності відповідно йдуть – внутрішньовенне, внутрішньом'язове та інтраназальне [39]. В експериментальних дослідженнях на тваринах та тестах з тироліберином на людях за даними ряду дослідників дози ТРГ коливаються в межах від 3,0 до 500 мкг/кг маси тіла [40–43].

Критеріями оцінки ефективності ДЗ та тироліберину є показники вмісту тироїдних гормонів у сироватці крові (бажано і ЩЗ) та результати гісто-морфологічного та морфометричного дослідження ЩЗ тварин.

Згідно з даними наших досліджень, рівень ТТГ у крові у ТРГ-стимульованих тварин підвищувався помірно (у середньому на 20%), однак приріст вмісту тироїдних гормонів у них коливався в межах 32–40% від контрольних значень; ЩЗ (за даними гісто-морфологічних досліджень) відрізняється більш високою функціональною активністю, ніж в контролі. Основна маса фолікулів має невеликий розмір, хоча в окремих ділянках залози спостерігається достатня кількість середніх та проміжних фолікулів. У малих та середніх фолікулах колоїд світлозбарвлений, з невеликими вакуолями, він заповнює весь просвіт фолікула. Іноді зустрічаються одиничні великі вакуолі. Відзначається чітка гіперплазія та гіпертрофія епітеліальних клітин навіть у малих фолікулах, вакуолізація їхньої цитоплазми. На окремих ділянках залози зустрічаються дрібні осередки проліферації. Означені зміни в поєднанні з втратою ваги свідчать про розвиток у піддослідних тварин стану гіпертирозу.

Слід відзначити, що спільне використання моделі збудження ЩЗ шляхом часткової тироїдектомії зі стимуляцією тироліберином дає більш виразну картину морфологічних змін тканини залози, яка характерна для гіперфункціонуючої ЩЗ. При такому способі моделювання необхідно в якості контролів використовувати групи псевдооперованих тварин та тварин з частковою тироїдектомією, яким вводиться фізіологічний розчин.

#### 2.2.5. Визначення активності тиростатичних засобів за умов *in vitro*

У випадках, коли це дозволяють умови проведення апробації, тиростатичні та тироїдстимулюючі сполуки повинні пройти біотестування на субопераційно отриманій тканині ЩЗ людини за умов *in vitro*. Оскільки на експериментальних моделях гіпертирозу неможливо адекватно відтворити патологічний стан ЩЗ, відповідний ДТЗ, необхідність такої роботи виходить з таких положень: можливість видової чутливості ЩЗ до дії ефектора, залежність результату від вихідного функціонального стану залози. Тому тестування ДЗ в експериментах *in vitro* з використанням ЩЗ людини дозволить наблизити адекватність ефекту на ЩЗ у хворих на ті чи інші тиропатії.

Критеріями ефективності тиростатичних засобів при апробації *in vitro* на ЩЗ людини є: рівень секреції тироїдних гормонів (вміст  $T_3$  та  $T_4$  в інкубаті), акумуляція циклічних нуклеотидів,

в першу чергу цАМФ, у тканині видаленої ЩЗ, захоплення  $^{14}\text{C}$ -тимідину фрагментами ЩЗ як показник білковосинтетичної функції залози. Програма досліджень обумовлюється можливостями лабораторії, але визначення вмісту тироїдних гормонів в інкубаті є обов'язковим.

При цьому слід враховувати ту обставину, що комерційні тест-системи, призначені для визначення загальних  $\text{T}_3$  та  $\text{T}_4$ , непридатні для такого визначення в інкубаті, тому що виявляють тільки зв'язані форми гормонів, а в інкубаті відсутні транспортні білки – тироксинзв'язуючі глобулін та альбумін. Тому слід користуватися або спеціальними наборами для визначення вільних форм  $\text{T}_3$  та  $\text{T}_4$ , або переводити гормони з вільної форми у зв'язану. Для цього, перед внесенням проби, що тестується, в робочі пробірки для RIA або імуоферментного визначення вмісту загальних  $\text{T}_3$  та  $\text{T}_4$ , необхідно додати нормальну кінську сироватку в співвідношенні 2:1. Паралельно за допомогою цих же наборів визначається середній рівень вмісту тироїдних гормонів у даній сироватці, розведеної для адекватності умов в такому ж співвідношенні чистим інкубаційним розчином.

Для проведення даного дослідження фрагменти ЩЗ масою 50 мг, одержані під час субтотальної тироїдектомії у хворих на ДТЗ, після 45-хвилинної преінкубації в 500 мл середовища 199 при  $37^\circ\text{C}$  переносяться до флаконів, які містять 1 мл робочої суміші. До її складу на 1 мл середовища 199 входять: 1 мг бичачого альбуміну, 20 ммоль *Nepes* (Merk, Німеччина), 5–10% ембріональної сироватки, 100 ОД гентаміцину, а також ДЗ або стандартний тиростатик у тих самих концентраціях, що й ДЗ. Їхній вміст в інкубаті коливається у межах  $10^{-6}$ – $10^{-9}$  М. Реакція протікає при  $37^\circ\text{C}$ . Паралельно проводять інкубацію контрольних зразків тієї ж ЩЗ, які не зазнають впливу ефекторів.

Інкубація зрізів залози може проходити в два етапи. Після першого етапу, який триває 180 хвилин, з флаконів, які містять робочу суміш та фрагменти ЩЗ, відбирають по 200 мкл інкубату для подальшого визначення у ньому вмісту вільних форм тироїдних гормонів, після чого тканину ЩЗ переносять у нові флакони, які містять 1 мл інкубаційної суміші. Цей етап дозволяє оцінити вплив ДЗ на секреторну активність зрізів ЩЗ. Другий етап триває ще 15 годин, після чого знову відбираються аліквоти для подальших аналізів. Рівень тироїдних гормонів у відбраному інкубаті у цьому разі характеризує здатність ДЗ впливати на синтетичні можливості фрагментів ЩЗ.

Термін інкубації тканини ЩЗ з ефектором залежить від задач дослідження: у разі визначення рівня секреції тироїдних гормонів залозою в інкубаті оптимальним вважається 180 хвилин, у разі визначення акумуляції в ній цАМФ – 20–30 хвилин, у разі оцінки рівня захоплення  $^{14}\text{C}$ -тимідину – 60 хвилин.

Максимально ефективною концентрацією ДЗ слід вважати ту, яка викликає зниження показника, що аналізується (тобто вміст тироїдних гормонів в інкубаті, накопичення цАМФ або поглинання  $^{14}\text{C}$ -тимідину зразками ЩЗ), не менше ніж на 20% від контрольних значень.

Оскільки метою використання тиростатичних засобів є, перш за все, пригнічення секреторної функції ЩЗ, у даному разі основним критерієм, який визначає ефективність, є зміни викиду тироїдних гормонів в інкубаційне середовище, та саме цей показник є основним під час оцінки дії ДЗ за умов *in vitro*.

Дослідження акумуляції цАМФ та включення  $^{14}\text{C}$ -тимідину в тканину ЩЗ, хоча й поступаються за пріоритетом оцінці секреторної функції фрагментів залози, їх бажано включати до комплексної оцінки тиростатичної активності ДЗ, оскільки вони розширюють уявлення про можливі механізми антитироїдної дії ДЗ.

Для екстракції цАМФ з тканини ЩЗ її зрізи (50 мг) після 30-хвилинної інкубації з ефекторами у вищезгаданих умовах гомогенізують у 6% трихлороцтовій кислоті (ТХО) при  $4^\circ\text{C}$  та центрифугують 15 хвилин при 2500 g. Супернатант обробляють 5-кратним об'ємом водонасиченого діетилового ефіру. Фракції ефіру видаляють. Водні екстракти, які містять цАМФ, висушують при  $60^\circ\text{C}$ . Одержані осадки розчиняють у фосфатному буфері, аліквоти беруть для визначення вмісту цАМФ методом RIA, зазвичай за допомогою імпортованих наборів (Словаччина, Англія).

Для визначення поглинання міченого тимідину наважку ЩЗ (50 мг) преінкубують при температурі 37°C протягом 30 хвилин. Після цього в 1 мл робочої інкубаційної суміші вводять 10 мкКи  $^{14}\text{C}$ -тимідину та інкубують упродовж однієї години. Тканину виймають, 5-разово промивають, промокають та гомогенізують. Гомогенат переносять у флакони та доливають 10 мл сцинтиляційної рідини. Після цього радіоактивність проб підраховують на бета-лічильнику протягом 100 секунд; відсоток поглинання порівнюють з показниками тотальної радіоактивності робочого розчину міток, який введено в інкубаційне середовище.

Хоча відповідь системи аденілатциклаза – цАМФ на дію ефекторів спостерігається досить швидко – за 20–30 хвилин, процес акумуляції циклічних нуклеотидів у тканині ЩЗ продовжується досить довго [44, 45]. У зв'язку з цим можливе одночасне дослідження впливу ДЗ на інтенсивність секреції тироїдних гормонів та на процес накопичення цАМФ у тканинах після першого етапу дослідження (180 хвилин). Після його завершення фрагменти ЩЗ переносять-ся до 6% розчину ТХО для подальших досліджень.

### 3. Вивчення специфічної активності тироїдстимулюючих засобів в експериментах *in vivo* та *in vitro*

Нині все більше поширюється захворювання на первинний гіпотироз (ГТЗ), який виникає на базі аутоімунного тироїдиту. У переважній більшості випадків (90–95%) захворювання гіпотирозом обумовлено патологічними процесами в самій ЩЗ, які знижують рівень продукції тироїдних гормонів [20, 46]. На жаль, пошук активних неспецифічних стимуляторів ЩЗ, які здатні відновлювати її функціональну активність, до цього часу не досяг великого успіху, тому дослідження в цьому напрямку набувають все більшого значення.

#### 3.1. Вивчення тироїдстимулюючих засобів на експериментальних моделях

Для вивчення тироїдстимулюючих засобів в експериментах *in vivo* рекомендується використання таких моделей гіпотирозу: ятрогенний, післяопераційний та пострадіаційний, а також ГТЗ, який розвивається у тварин на фоні аутоімунних процесів у ЩЗ.

Моделювання експериментального ГТЗ проводиться на щурах популяції Вістар масою 150–180 г або на кролях породи Шиншила масою 2–3 кг. Використання кролів є доцільнішим у зв'язку з більш високим відсотком відтворення тиропатій.

Як об'єкт для проведення досліджень *in vitro* може бути використана ЩЗ хворих на зоб Хашімото, яких піддавали оперативному втручання.

##### 3.1.1. Модель хімічно індукованого гіпотирозу

Хімічно індукований ГТЗ викликається тривалим (протягом 8 тижнів) введенням тваринам препаратів імідазолу або тіоссчовини. Доза мерказолілу, достатня для вірогідного пригнічення функціональної активності ЩЗ, у даному експерименті коливається в межах 3–5 мг/кг маси тіла [47], метилтіоурацилу або пропілтіоурацилу, який широко використовується останнім часом, – 50–60 мг/кг маси тіла [48, 49]. Однак, з нашої точки зору, найбільш ефективним є застосування мерказолілу, тому що разом з дією на синтез тироїдних гормонів у ЩЗ він впливає на імунну систему організму в цілому та, зокрема, на імунні процеси в ЩЗ [50–52].

Тваринам вводять стимулятори, що вивчаються, паралельно з інгібіторами тироїдної функції ЩЗ, починаючи з 5 тижня експерименту. Вплив неспецифічних тироїдних стимуляторів оцінюється як за результатами гістологічного дослідження ЩЗ, так і за ступенем «протидії» зниженню рівня тироїдних гормонів та підвищенню рівня ТТГ у крові тварин. Критерії оцінки ефективності впливу ДЗ стандартні – рівень  $T_3$ ,  $T_4$ , ТТГ в крові та результати гістоморфологічного та морфометричного дослідження ЩЗ. Самостійне введення препаратів призводить до пригнічення тироцитів: вони зменшуються за розміром, погано забарвлюються

на РНК, знижується їхня синтетична активність.

Як було відзначено вище, тривале введення тиростатичних засобів, особливо мерказолілу, викликає в ЩЗ ознаки аутоімунного тироїдиту, перш за все, у вигляді лімфоїдної інфільтрації залози. Тому даний варіант ГТЗ представляє собою комбіновану форму тиропатії, що виникає як у зв'язку із впливом препаратів на синтез та секрецію тироїдних гормонів, так і у зв'язку з інфільтрацією ЩЗ лімфоцитами, які є джерелом утворення специфічних аутоантитіл [53, 54].

### 3.1.2. Модель післяопераційного гіпотирозу

Природно, що після тотального видалення ЩЗ призначення стимуляторів функції є безглуздом, а ЩЗ після геміструмектомії при наявності достатніх резервних можливостей та адаптивної гіперфункції залишеної частки залози також не може бути об'єктом впливу стимуляторів. Однак видалення 2/3 ЩЗ неминуче призводить до розвитку ГТЗ, що створює можливість для проведення апробації тироїдстимулюючих засобів. Деякі дослідники [55] пропонують використовувати комбіновану модель – парціальну тироїдектомію з одночасним видаленням верхнього шийного симпатичного вузла, котре само по собі викликає зниження тироїдної функції та потенціює результати парціальної тироїдектомії. До такого ж результату призводить двобічне uszkodження гіпоталамічного паравентрикулярного ядра [56, 57], так званий гіпоталамічний ГТЗ [58].

ДЗ починають вводити з 30 доби після операції. Співставляють активність ДЗ за прийнятими критеріями – рівень тироїдних гормонів та результати гісто-морфологічного та морфометричного дослідження.

### 3.1.3. Модель пострадіаційного гіпотирозу

Для моделювання ГТЗ шляхом радіаційного впливу зазвичай використовують доволі високі дози (600–700 мкКи  $^{131}\text{I}$ ) [59].  $^{131}\text{I}$  вводиться одноразово внутрішньоочередово або підшкірно. Прояви ГТЗ розвиваються за 2 місяці. Починати застосування засобів з очікуваним тироїдстимулюючим ефектом доцільно через 1 місяць після радіаційного впливу та продовжувати протягом 2 місяців. Ефект радіації може бути отриманий й при використанні менших доз (450 мкКи  $^{131}\text{I}$ ), але в таких випадках зміни стосуються тільки рівня  $T_4$  та ТТГ [60].

### 3.1.4. Модель гіпотирозу аутоімунного генезу

ГТЗ у більшості випадків розвивається на фоні імунних уражень, які відбуваються в ЩЗ: зменшення кількості активно функціонуючої тироїдної паренхіми [53, 61] та, як наслідок, порушення синтезу тироїдних гормонів [62–64]; зниження функціональних резервів ЩЗ [65]. Крім дистрофічних змін у тироїдній паренхімі, можливе також порушення зв'язування тироїдних гормонів у периферичній крові, що посилює стан гіпотирозу [66, 67].

Для отримання моделі ГТЗ аутоімунного генезу проводиться 3-тижнева імунізація тварин антигеном ЩЗ людини, виділеної субопераційно, в комбінації з повним ад'ювантом Фрейнда. Виділення антигену ЩЗ людини проводять за А.О. Vladutin [68]. Для цього фрагмент ЩЗ гомогенізують у 0,15 М НСІ в об'ємному або ваговому співвідношенні 1:3. Гомогенат витримують одну добу при температурі 4–8°C, після чого 10 хвилин центрифугують при 2000 g. Одержаний супернатант і є антигеном, котрий використовується в подальшому для імунізації тварин. Окремі аліквоти можуть зберігатися в замороженому стані 2–3 тижні.

Для подальшого розрахунку кількості антигену, що вводиться тваринам, у супернатанті необхідно визначити кількість білка будь-яким зручним для дослідника методом.

Далі, за методикою, описаною О.Е.Вязовим [69], проводиться імунізація протягом 3 тижнів. Перший раз тваринам внутрішньовенно вводиться 0,5 мг білка-антигену на фізіологічному розчині. Загальний об'єм ін'єкції складає 0,5 мл. Одночасно підшкірно в область черевної



стілки у 6 місячх вводять суміш повного ад'юванта Фрейнда з антигеном: 0,1 мл ад'юванта та 0,1 мг білка-антигена у 0,1 мл фізрозчину. За 4 дні кролям внутрішньовенно вводиться 0,5 мг білка-антигена у 0,5 мл фізрозчину. За 7 днів після першого введення цикл повторюють.

Після закінчення імунізації тваринам протягом 10–14 днів дають ДЗ з очікуваними тироїд-стимулюючими властивостями. Оцінка ефективності сполук, що тестуються, проводиться так само, як у випадках, що описані вище.

Слід підкреслити, що при роботі з усіма моделями гіпотирозу визначальним гормональним показником функції ЩЗ є рівень ТТГ в периферичній крові, тому що зниження або підвищення його рівня може виявлятися раніше, ніж зміни концентрації  $T_3$  та  $T_4$ .

Для визначення вмісту ТТГ у плазмі (сироватці) крові експериментальних тварин за відсутності тест-систем із специфічними антисироватками (відповідно щурячої або кролячої) можуть бути використані комерційні набори, що призначені для аналогічних досліджень у людини. Динаміка показників вмісту ТТГ, що визначається за допомогою таких тест-систем, досить інформативна [70] та може бути рекомендована до використання.

### 3.1.5 Визначення активності тироїдстимулюючих сполук в умовах *in vitro*

Як об'єкт для вивчення дії неспецифічних тироїдних стимуляторів рекомендується використання субопераційно вилученої ЩЗ хворих на зоб Хашімото. Оперативному лікуванню піддаються тільки ті хворі на аутоімунний тироїдит, в яких зоб досягає III та більшого ступеню та не лікується консервативно. Як правило, у цих випадках вже є ознаки ГТЗ.

Випробування нових тироїдних препаратів в умовах *in vitro* на ЩЗ людини не проводиться, оскільки вони є засобами замісної терапії та в значній мірі блокують власну функцію ЩЗ.

Оцінка ефективності неспецифічних тироїдних стимуляторів проводиться за такою ж схемою, що й апробація тиростатичних засобів.

Окрім таких показників, як секреція тироїдних гормонів у інкубаційне середовище, акумуляція цАМФ та захоплення  $^{14}\text{C}$ -тимідину, може бути використаний тест чутливості залози до дії відомих гормональних стимуляторів, наприклад, норадреналіну, який вводиться в інкубат у концентрації  $5 \cdot 10^{-6}$  М, або ТТГ (його ефективна концентрація в інкубаті складас 0,01–0,1 Од/мл) [45, 71]. ДЗ, підвищуючи чутливість ЩЗ до вказаних стимуляторів, можуть потенціювати їхню дію.

## Література

1. Методические рекомендации по доклиническому изучению тиреостатических и тиреостимулирующих средств/Е.С.Ром-Богуславская, И.В.Комарова, А.А.Кириченко и др.– К., 1995.– 16 с.
2. Перелік зареєстрованих в Україні лікарських засобів//Фармакол. вісн.– 1998.– № 1–12 (додаток).
3. Lagorce J.F., Comby F., Vuxeraud J. et al./Eur. J. Med. Chem.– 1992.– V.27.– P. 359–368.
4. Кабак Я.М. Практикум по эндокринологии.– М.: Изд-во МГУ, 1968.– 277 с.
5. Бонашевская Т.И., Беляева Н.Н., Купман Н.Б., Панасюк Л.В. Морфофункциональное исследование в гигиене.– М.: Медицина, 1984.– 214 с.
6. Войно-Ясенецкий М.В., Жаботинский Ю.М. Источники ошибок при морфологических исследованиях.– Л.: Медицина, 1970.– 156 с.
7. Арцин Л.И., Бабаева Л.Г., Гельфанд В.Б. и др. Структурные основы адаптации и компенсации нарушенных функций.– М.: Медицина, 1987.– 436 с.
8. Кувенева О.Н. Влияние лазерного и рентгеновского изучения на количественные морфометрические параметры ЩЖ крыс репродуктивного возраста//Вісн. морфол.– 1998.– №1.– С. 76–77.
9. Рыжова Т.И. Структура и функция щитовидной железы в условиях введения ганглиоблокирующих веществ//Нейроэндокринные корреляции.– Обнинск, 1968.– С. 52–53.

10. Божко Т.С., Кустова С.П., Воробейчик М.А. и др. Получение и свойства некоторых солей N-сукциноил-L-дийотирозина//Матер. VIII науч.-практ. конф. по созданию и апробации новых лекарств «Лекарства – человеку».– Вильнюс, 1998.
11. Безуглий П.О., Таран С.Г., Горохова О.В. та ін. Оптимальний синтез та антитироїдна активність 1Н-3-(бензімідазоліл-2)-4-гідроксихінолону-2//Матер. ювіл. конф.– Харків, 1996.– С. 109–112.
12. Українець І.В., Таран С.Г., Горохова О.В. та ін. Алкіламіди ін-2-оксо-4-гідроксихінолін-3-карбонової кислоти – нова група потенційних антитироїдних засобів//Фармац. журн.– 1995.– С. 54.
13. Селятицкая В.Г., Одинцов С.В., Обухова Л.А., Пальчикова Н.А. Морфофункциональные изменения щитовидной железы у лабораторных животных при действии холода//Пробл. эндокринол.– 1998.– №4.– С. 40–42.
14. Туракулов Я.Х. Биохимия и патохимия щитовидной железы.– Ташкент: Изд-во АН Узб. ССР, 1963.– 403 с.
15. Физиология эндокринной системы. Серия: руков. по физиологии/Под ред. В.Г.Баранова и др. – Л.: Наука, 1979.– 968 с.
16. Зензеров В.С., Дерев И.И., Яковлев В.А. Щитовидная железа в условиях холодого стресса//Стресс и его патологические механизмы.– Кипинев: Штиинца, 1973.– С. 207–209.
17. Tuominen R.K. Attempts to antagonize the effect of histamine on the cold-stimulated thyrotropin secretion in male rat//Acta Pharmacol. Toxicol.– 1985.– V.57, №5.– P. 371–377.
18. Okuda C., Mizobe T., Miyazaki M. et al. Alteration of dopamine and TRH in rat brain during hypothermia//J. Pharmacobio-Dyn.– 1986.– V.9, №8.– P. 98.
19. Эмирбеков Э.З., Львова С.Н., Гасангаджиева А.Г. Влияние многократного холодого стресса на интенсивность перекисного окисления липидов и антиоксидантную систему тканей//Бюл. эксп. биол. и мед.– 1998.– Т.125, №4.– С. 385–387.
20. Руководство по клинической эндокринологии//Под. ред. Н.Т.Старковой.– СПб.: Питер, 1996.– 544 с.
21. Ramirez L., Braverman L.E., White B. et al. Recombinant human thyrotropin is a potent stimulator of thyroid function in normal subjects//J. Clin. Endocrinol. Metab.– 1997.– V.82, №9.– P. 2836–2839.
22. Kubota K., Uchimura H., Mitsuhashi T. et al. Effects of intrathyroidal metabolism of thyroxine on thyroid hormone secretion: increased degradation of thyroxine in mouse thyroids stimulated chronically with thyrotropin//Acta endocrinol.– 1984.– V.105, №1.– P. 57–65.
23. Lederbogen S., Olbricht Th., Benker G. et al. Schild-drusenfunktionsreserve nach TSH-Stimulation. Effect elner jodidbehandlung im jodmangelgebiet//Klin. Wochen schr.– 1989. – Bd.67 (Suppl.), №16.– S. 279–280.
24. Строев Е.А., Булаева Н.Н., Кочулов М.Ю. и др. Кальциевый ответ тиреоцитов при изменениях функционального состояния щитовидной железы//Бюл. эксп. биол. и мед. 1998.– Т.125, №1.– С. 101–103.
25. Гуров И.М. Влияние тиреотропина, пролактина и хориогонина на щитовидную железу в норме и при аутоиммунном тиреоидите: Автореф. дисс. ...канд. мед. наук.– Харьков, 1986. – 18 с.
26. Krupp P.P., Lee K.P. Ultrastructure and cytochemistry of thyroid lysosome following subtotal thyroidectomy//Anat. Res.– 1986.– V.214, №2.– P. 177–182.
27. Sinadinovic J., Micic J.V., Kraiucanic M. et al. Depletion and reaccumulation of follicular thyroglobulin (TG) in guinea-pig thyroid gland after short- and long-term administration of thyrotropin//Exp. Clin. Endocrinol.– 1984.– V.84, №1.– P. 52–62.
28. Bagchi N., Brown T.R. Repeated thyrotropin stimulation of thyroid secretion. Lack of refractoriness in vivo//J. Endocrinol.– 1995.– V.106, №2.– P. 153–157.
29. Nielsen T.B., Ferdows M.S., Brinkley B.R et al. Morphological and biochemical responses of cultured thyroid cells to thyrotropin//Endocrinol.– 1985.– V.116, №2.– P. 788–797.

30. Stringer B.M.J., Wynford-Thomas D., Gomez-Morales M. et al. Reparative growth in the rat thyroid: effect of TSH suppression//Cell and Tissue Kinet.– 1986.– V.19, №1.– P. 49–56.
31. Gerendai J., Nemeskeri A., Faivre-Dauman A. et al. Effect of unilateral or bilateral thyroidectomy on TRH content of hypothalamus halves//J. Endocrinol. Invest.– 1985.– V.8, №4.– P. 321–323.
32. Алешин Б.В. О некоторых спорных вопросах современной цитофизиологии щитовидной железы//Усп. совр. биол.– 1982.– Т.93, вып.1.– С. 121–138.
33. Malendowicz L.K. Hyperresponsiveness of residual thyroid lobe of hemithyroidectomised rat to thyrotropin//Horm. Metab. Res.– 1987.– V.19, №10.– P. 478–480.
34. Clark O.H., Lambert W.R., Cemir S.M., Jngbar S.H. Binding of bovine thyrotropin to specific sites in thyroid tissue from control and hemithyroidectomised rats//J. Surg. Res.– 1985.– V.39, №6.– P. 489–498.
35. Pekary A.T., Richkind M., Hershman I.M. Thyrotrophin releasing hormone and related peptides in canine tissues//J. Endocrinol. – 1983.– V.98, №3.– P.299–306.
36. Iglesias R., Llobera M., Montoya E. Sequential changes in the pituitary thyroid after chronic TRH administration: Effects on euthyroid and thyroxine treated female rats//Acta Endocrinol.– 1985.– V.109, №2.– P. 237–242.
37. Iversen E., Laurberg P. Thyrotrophin-releasing hormone (TRH) and hormone secretion from the follicular and C-cells of perfused dog thyroid lobes//Acta Endocrinol.– 1985.– V.109, №4.– P. 499–504.
38. Prasad Ch. Thyrotropin-releasing hormone//Handb. Neurochem. V.8.– New York– London, 1985.– P. 175–200.
39. Staub J.J., Riff-Deleche A.S., Paul S. et al. Intranasal thyrotrophin releasing hormone is a potent stimulus for TSH release in man (comparison with intravenous and oral TRH//Clin. Endocrinol.– 1985.– V.22, №4.– P. 567–572.
40. Schwartz K.-D., Finck W., Michael R. Stimulation und Inhibition der thyreotropen Hypophysenfunktion. Neue Untersuchungsergebnisse durch Infusion von Schilddrüsenhormon und Transfusion von hyperthyreotem Spenderplasma beim Menschen//Dtsch. gesundheitsw.– 1979.– Bd.34, №5.– S. 197–204.
41. Schafgen W., Schatz H. Dissociation of thyroidglobulin and thyroid hormone secretion following endogenous thyrotropin stimulation by oral TRH//Horm. Metabol. Res.– 1984.– V.16, №11.– P. 615–616.
42. Inanmi O., Sato A., Sato Y. Thyrotrophine releasing hormone increases cerebral blood flow in both adult and aged rats//Neurosci. Res.– 1987.– V.5 (Suppl.), №7.– P. 20.
43. Amir S.. Thyrotropin-releasing hormone (TRH) blocks glucagon-induced hyperglycemia in mice: dissociation of the antyperglycemic and pituitary actions of TRH//Brain. Res.– 1988.– V.455, №1.– P. 201–203.
44. Hirayu H., Magnusson R.P., Rapoport B. Studies on the mechanism of desensitization of the cyclic AMP response to TRH stimulation in a cloned rat thyroid cell line//Mol. Cell Endocrinol.– 1985.– V.42, №1.– P. 21–27
45. Witte A., McKenzie J.M. Regulation of the rat thyrotropin receptor in vitro//Endocrinol.– 1981.– V.108, №1.– P. 305–309.
46. Эндокринология/Под ред. Н.Лавина.– М.: Практика, 1999.– 1130 с.
47. Wang J.F., Milosveski V., Schramek C. et al. Presence and possible role of vascular endothelial growth factor in thyroid cell growth and function//J. Endocrinol.– 1998.– V.157, №1.– P. 5–12.
48. Franklin J.A., Wood D.F., Balfour N.J. et al. Effect of hypothyroidism and thyroid hormone replacement in vivo on pituitary cytoplasmic concentrations of thyrotropin- $\alpha$  and  $\beta$ -subunit messenger ribonucleic acids//Endocrinol.– 1987.– V.120, №6.– P. 2279–2288.
49. Li M., Boyages S.C. Expression of  $\beta_2$ -thyroid hormone receptor in euthyroid and hypothyroid rat pituitary gland: An in situ hybridization and immunocytochemical study//Brain. Res.– 1997.– V.773, №1–2.– P. 125–131.
50. McKenzie L. Hyperthyroidism//Endocrinology/Ed. by J.De Groot.– 1989. Vol.1.– P. 646–682.

51. А.с.1252812 СССР, МКИ4G09В 23/28. Способ моделирования футоиммунного тиреоидита/Бриндак О.И., Полторац В.В., Ладогубец Е.В. (СССР).– № 3731757/23–14; Заяв. 23.04.84; Опубл.23.08.86, Бюл. № 31. – 31 с.
52. Боднар П.М., Діденко П.І., Щербак О.В. та ін. Побічні ефекти тиростатиків//І Нац. з'їзд фармакологів «Сучасні проблеми фармакології»: Тези допов.– Полтава, 1995.– С. 18.
53. Guo F., Faum F.C., Rapoport B. et al. Recombinant thyroid peroxidase-specific Fab converted to immunoglobulin G molecules: Evidence for thyroid cell damage by IgG1, but not IgG4 autoantibodies//J. Clin. Endocrinol. Metab.– 1997.– V.82, №3.– P. 925–931.
54. Okumura M., Hidaka Y., Kuroda S. et al. Increased serum concentration of soluble CD30 in patients with Graves' disease and Hashimoto thyroidites//J. Clin. Endocrinol. Metab.– 1997.– V.82, №6.– P. 1757–1760.
55. Langer P., Mess B., Ruzsus et al.//Endocrinol. Exp.– 1989.– V.23, №3.– P. 167–183.
56. Murakami M., Tanaka K., Greer M.A., Mori M. Anterior pituitary type II thyroxine 5'-deiodinase activity is not affected by lesions of the hypothalamic paraventricular nucleus which profoundly depress pituitary thyrotropin secretion//Endocrinol.– 1988.– V.123, №3.– P. 1676–1681.
57. Yamada M., Mori M. Alteration by thyroid hormones of TSH in the rat median eminence: Role of the hypothalamic paraventricular nucleus // Exp. and Clin. Endocrinol. – 1989. – 122, № 1. – P. 104–110.
58. Taylor T., Gesundheit N., Gyves P.W. et al. Hypothalamic hypothyroidism caused by lesions in rat paraventricular nuclei alters the carbohydrate structure of secreted thyrotrophin//Endocrinol.– 1988.– V.122, №1.– P. 283–290.
59. Ratzmann L., Hartmann S., Pflugrad T.K. et al.//Endocrinol. (Lpz.).– 1977.– Bd.70, №1.– S. 53–68.
60. Reilly C.P., Symons R.G., Wellby M.L. A rat model of the <sup>131</sup>I-induced changes in thyroid function//J. Endocrinol. Invest.– 1986.– V.9, №5.– P. 367–370.
61. Takasu M., Yamada T., Sato A. et al. Grave's disease following hypothyroidism due to Hashimoto's disease: study of eight cases//Clin. Endocrinol.– 1990.– V.33.– P. 687–698.
62. Руководство по клинической эндокринологии/Под. ред. В.Г.Барапова.– Л.: Медицина, 1977.– 60 с.
63. Sato K., Jikamura K., Yoshinaki M. et al. Goitrous hypothyroidism with blocking and stimulating thyrotropin binding inhibitor immunoglobulins//J. Clin. Endocrinol. Metab.– 1990.– V.71. – P. 885–860.
64. Prentice L., Phillips D., Sarsero D. et al. Geographical distribution of subclinical autoimmune thyroid disease in Britain: A study using highly sensitive direct assays for autoantibodies to thyroglobulin and thyroid peroxidase//Acta Endocr.– 1990.– V.123.– P. 493–498.
65. Marquess E., Yill F.A., Mandel S.F. Thyroiditis after pregnancy loss//J. Clin. Endocrinol. Metab.– 1977.– V.82, №8.– P. 2455–2457.
66. Pardini V., Reis R., Parish S. et al. Tireoidite de Hashimoto com aumento unesperado de triiodotironina: Anticorpo anti-triiodotironina//J. Bras. patol.– 1997.– V.33, №4.– P. 196–200.
67. Раскин А.М. Аутоиммунные процессы в патологии щитовидной железы.– Л.: Медицина, 1973.– 224 с.
68. Vladutin A.O., Rose N.R. Autoimmune murine thyroiditis. Relation to histocompatibility (H-2) type//Sci.– 1971.– Vl.197, №4014.– P. 1137–1139.
69. Лабораторные методы исследования в неинфекционной иммунологии/Под ред. О.Е.Вязова.– М.: Медицина, 1967.– 355 с.
70. Larsson M. Evaluation of a human TSH radioimmunoassay as a diagnostic test for canine primary hypothyroidism//Acta Vet. Scand.– 1981.– V.22, №3–4.– P. 589–591.
71. Goretzki P.E., Koob R., Kollen Ch., Roher H.-D. Thyrotropin (TSH) stimulates cell growth and DNA synthesis in monolayer cultures of human thyrocytes independent of the adenylate-cyclase system//Acta Endocrinol.– 1987.– V.281 (Suppl.).– P. 273–280.

# СКРИНІНГОВІ ДОСЛІДЖЕННЯ РЕЧОВИН З ПЕРЕДБАЧУВАНОЮ АНДРОГЕННОЮ ТА АНТИАНДРОГЕННОЮ АКТИВНІСТЮ

Гладкова А.І.,  
Сергієнко Л.Ю.

## Вступ

Проблема створення нових лікарських засобів, здатних коригувати гормональний фон в організмі людини, особливо загострилася у зв'язку з погіршенням екологічної ситуації, зокрема, в Україні.

Ендокринна система, котра забезпечує адаптацію організму, знаходиться постійно під дестабілізуючою дією чинників навколишнього середовища, що призводить до значного росту дисфункцій усіх ендокринних залоз. За цих умов пошук та створення нових гормональних, гормоноподібних та антигормональних препаратів набуває все більшої актуальності.

Повною мірою вищесказане стосується системи чоловічих статевих гормонів (андрогенів) та їх антагоністів (антиандрогенів). Дані методичні рекомендації пропонуються з метою уніфікації підходів до оцінки специфічної андроген-анаболічної та антиандрогенної активності сполук шляхом застосування стандартних експериментальних прийомів та моделей. Останнє дозволить об'єктивно оцінити на сучасному рівні специфічний ефект речовин, що тестуються, отримати у різних лабораторіях співставлювані результати та оптимізувати процес відбору потенційних лікарських засобів для клінічних досліджень.

Вивчення андрогенних та антиандрогенних властивостей необхідне у разі направленої синтезу сполук. Окрім того, ряд лікарських препаратів, застосування яких виходить за межі ендокринних захворювань, можуть проявляти андрогенну (рідко) або антиандрогенну (значно частіше) дію, тому для таких речовин теж доцільно мати уявлення про наявність андроген-анаболічних або антиандрогенних властивостей.

Біологічні методи визначення андрогенних чи антиандрогенних властивостей можуть стати в нагоді також при аналізі продуктів харчування у зв'язку з використанням анаболіків при відгодівлі худоби.

Перелік тестів, спрямованих на визначення механізмів дії нових речовин з встановленою у скринінгових дослідженнях андрогенною або антиандрогенною дією дуже великий і має визначатися у кожному випадку окремо. Автори цих методичних рекомендацій не ставили перед собою завдання представити методи визначення механізмів дії, а зосередили увагу на методичних підходах по встановленню специфічної (андроген-анаболічної або антиандрогенної) дії, тобто на етапі так званих скринінгових досліджень.

Дані по вивченню специфічних андрогенних та антиандрогенних властивостей є частиною загальних доклінічних досліджень.

## 1. Андрогени

### 1.1. *Натуральні андрогени*

Андрогени – стероїдні гормони, що продукуються в чоловічому та жіночому організмі в статевих і частково в надниркових залозах. Деяка кількість андрогенів може утворюватись із їх попередників у периферичних тканинах.

Кількість андрогенів, що синтезується в природних умовах, досить велика. За структурою андрогени можуть належати до андростенового або андростанового ряду, що обумовлює їх різні біологічні властивості. За своєю активністю (за тестом на сім'яних пухирцях) вони розподіляються у наступному низхідному порядку: 5 $\alpha$ -дигідротестостерон (ДГТ); тестостерон; 17-метил-3 $\alpha$ , 17 $\beta$ -діокси-5 $\alpha$ -андростан; 3 $\alpha$ , 17 $\beta$ -андростандіол; андростендіон; андростандіон; 3 $\alpha$ , 17 $\beta$ -андростандіол; андростерон; 5-андростен-3,17-діон; дегідроепіандростерон; епіандростерон.

### 1.2. Фізіологічні властивості. Клінічне застосування

Фізіологічне значення андрогенів багатогранне. У чоловіків під впливом андрогенів відбувається статеві диференціація мозку, формування вторинних статевих ознак, стимулюються окремі стадії сперматогенезу, лібідо, еякуляція. У жінок андрогени можуть бути антагоністами естрогенів, що реалізується в пубертатному періоді, в фолікулогенезі, у пологовій діяльності; у жінок андрогени стимулюють статевий потяг, секрецію маткових залоз, ріст та кератинізацію піхви. У осіб обох статей андрогени впливають на всі види обміну речовин – білковий, ліпідний, вуглеводний, виявляючи виразну анаболічну дію, що обумовлює їх застосування при різних неендокринних захворюваннях, наприклад, при виразках шлунково-кишкового тракту, при ішемічній хворобі серця, анеміях та ін.

У чоловіків андрогени використовуються при гіпогонадізмі, послабленні статевого потягу, порушенні сперматогенезу, затримках статевого дозрівання, клімактеричному синдромі.

У жінок андрогени застосовуються в усіх випадках, коли необхідно нейтралізувати вплив естрогенів – при маткових кровотечах, гормонозалежних пухлинах, мастопатіях.

Найчастіше у терапевтичній практиці користуються таким андрогеном як тестостерону пропіонат (тестостеронпропіонат). Він же використовується, звичайно, як контрольний стандартний препарат. Нестерифікований тестостерон застосовують лише з дослідницькою метою. Різні ефіри тестостерону (в тому числі і пропіонат) пролонгують дію гормону, комбінація декількох ефірів забезпечує ще більшу тривалість ефекту.

Незважаючи на наявність значної кількості природних андрогенів, в усьому світі проводиться безперервний пошук нових препаратів з андрогенною активністю, сполук направленої дії, які б використовувалися в клініці за різними призначенням.

Андрогени входять до складу багатокомпонентних гормональних препаратів, а саме, тестестату, примодіану, тестовіرونу, сустанону-50 (Югославія) та омнадрену (Польща), амбосексу (Угорщина), Б-73 (Болгарія), гравігносту (Німеччина), еструсиму (Румунія), фекундину (Швейцарія), овогену та дигітолу (Україна) та ін. Ефект андрогенної складової у деяких препаратах може модифікуватися естрогенами. Останнім часом віддається перевага пероральним формам андрогенів (андріол, местеролон) над ін'єкційними.

При визначенні андрогенних властивостей необхідно знати спосіб застосування майбутнього андрогену. Залежно від цього розробляється схема досліджень та використовуються відповідні методи вивчення.

Слід також ураховувати наявність локальних та системних ефектів. Для оцінки локальних ефектів звичайно використовують гістологічні та гістохімічні методи дослідження (в експерименті) або визначення клінічного ефекту, а також безпосереднього накопичення андрогенів в тканині.

Системні ефекти можуть бути оцінені кількома способами, в тому числі шляхом визначення концентрації гормону в крові та тканинах, дослідження вмісту гормонів, які знаходяться з андрогеном в конкурентних відносинах або зв'язані з ним за механізмом негативного зворотного зв'язку, наприклад, гонадотропінів. Нижче наведені найбільш поширені методи визначення андрогенної активності.

Складність виявлення андрогенної активності пов'язана з високою динамікою процесу і, у зв'язку з цим, важкістю встановлення оптимальних термінів обстеження, а також органів та тканин, що підлягають вивченню.

Правомірність вищесказаного підтверджується нашими дослідженнями фармакокінетики дигідротестостерону за допомогою  $^3\text{H}$ -ДГТ (у дозі 3,7 мБк  $5\alpha$ -ДГТ-1,2,4,5,6,7-Н-6 з питомою активністю 4588 ТБк/моль).

Вміст  $^3\text{H}$ -ДГТ ( Бк/мг/мл·10) у передміхуровій залозі становив через 2 год  $13,4\pm 1,2$ ; через 24 год –  $6,7\pm 0,7$ ; через 48 год –  $5,5\pm 0,3$ ; через 72 год –  $1,6\pm 0,8$ . У сім'яних пухирцях у ті ж строки:  $17,0\pm 2,6$ ;  $9,8\pm 1,2$ ;  $0,0\pm 0,1$ . Тобто, максимальна концентрація в цих андрогензалежних органах визначалась через 2 год після введення, а до 72 год спостерігалися лише фонові величини. При визначенні андрогенної активності в тесті з андрогензалежними органами слід приймати до уваги дві обставини. По-перше, наявність динаміки у часі, а, по-друге, відставлений у часі біологічний ефект, який проявляється у збільшенні маси органів. Останнє має місце на 3–4 день після прийому андрогену. Після одноразового введення зміни у масі органів дуже незначні, тому стандартна методика передбачає багаторазове введення (див. нижче).

При оцінці андрогенної активності за вмістом андрогену в крові також слід враховувати наявність певної динаміки. Після одноразового введення максимум накопичення спостерігається через 2 год (до  $14999\pm 2548$  Бк/мл · 10). Але уже через 24 години його вміст знижується до  $2961\pm 103$ , залишаючись приблизно на такому ж рівні і через 48 годин ( $2029\pm 103$ ) і лише через 72 години кількість андрогену різко зменшується ( $277\pm 81$ ), а через 7 днів досягає фонових значень.

У сечі мають місце зворотні процеси. Протягом першої доби після введення андроген не визначається, через 24 год з'являється у незначній кількості, досягає піку ( $46396\pm 16420$ ) через 48 годин. Після 72 год починається спад, але і через 7 діб андроген знаходиться у сечі ( $5080\pm 557$ ). Отже, при вивченні андрогенної активності за кількістю андрогену в крові дослідження слід виконувати у перші години після введення, а у сечі – через 3 доби.

При використанні іншого андрогену конкретні його рівні в крові та сечі, а також час прояву біологічних ефектів можуть відрізнятися від наведених у даному прикладі.

### **1.3. Оцінка андрогенної активності. Біологічне тестування**

Метод базується на реакції андрогензалежних органів на андроген. Випробування проводяться на статевонезрілих або на кастрованих чи гонадектомованих статевонезрілих тваринах, тобто у всіх випадках моделюється андрогенна недостатність.

Використання моделі визначається тривалістю експерименту. При випробуванні речовин з пролонгованою дією на статевонезрілих тваринах вилучення статевих залоз обов'язкове, тому що в іншому випадку буде мати місце спонтанне підвищення рівня андрогенів та маси андрогензалежних органів при настанні пубертату. Короточасний експеримент може бути виконаний на статевонезрілих тваринах. Однак, для стандартизації умов звичайно використовують кастрованих тварин, частіше шурів, хоча вид тварин не має принципового значення.

Рівень власних гормонів тварини внаслідок гонадектомії різко знижується вже в перші години та дні після операції. Для гарантії стабільно низького рівня андрогенів (певна кількість гормонів зберігається за рахунок адреналового біосинтезу) тварин залишають на 21 день, після чого починають введення речовини, що тестується. Введення проводять у кількох дозах. При виборі доз користуються результатами попереднього визначення гострої токсичності, а за їх відсутності – даними літератури стосовно терапевтичних доз близьких за будовою речовин. Введення проводять протягом 7 днів. Контролем є гонадектомовані тварини аналогічного віку та маси тіла, яким замість речовини, що тестується, вводять розчинник. Для стероїдних сполук звичайно для цього використовують кісточкову олію, для інших – розчини твіну, крохмалю.

Через добу після закінчення ін'єкцій (або перорального прийому) тварин декапітують. Виділяють та зважують сім'яні пухирці (СП), вентральну долю передміхурової залози (ВПЗ). Як правило, при вивченні андрогенної активності проводять випробування й на анаболічну активність. З цією метою зважують бульбо-кавернозні м'язи (m. levator ani, m. l. a.).

Додаткову інформацію про наявність андрогенної активності отримують, зважуючи тимус, надниркові залози та гіпофіз, а про анаболічну активність – зважуючи нирки та серце. Оскільки, як правило, оцінюють не абсолютні показники маси органів, а відносні, то необхідно мати дані про масу тіла піддослідних щурів у день забою.

Андрогенну активність визначають за приростом маси сім'яних пухирців та передміхурової залози у гонадектомованих та/або статевонезрілих тварин. Показником анаболічної активності є збільшення маси *m. levator ani*. Користуючись вказаними величинами, підраховують анаболічний індекс (AI) за формулою:

$$AI = \frac{\text{маса m.l.a. (досл.)} - \text{маса m.l.a. (контроль)}}{\text{маса ВПЗ (досл.)} - \text{маса ВПЗ (контроль)}} \quad 1.1$$

Враховуючи той факт, що чутливість СП та ВПЗ неоднакова по відношенню до різних андрогенів, краще обчислювати анаболічний індекс, виходячи з напівсуми мас СП та ВПЗ.

У цьому випадку у знаменнику формули (1.1) буде величина:

$$\frac{\text{маса СП} + \text{маса ВПЗ}}{2} \quad 1.2$$

Введення речовини з виразною андрогенною активністю некастрованим тваринам супроводжується пригніченням власної секреції андрогенів, про що свідчать дослідження з введенням міченого тестостерону та наступним визначенням його в крові, що відтікає від яєчка та надниркових залоз. Тому при тестуванні на некастрованих тваринах, хоча й визначається сумарна андрогенна активність (екзогенний андроген + ендогенний), але в плазмі кількісно переважає введений екзогенний гормон.

Описаний метод, незважаючи на те, що він здається простим та малочутливим (порівняно з радіоімунологічними методами), має низку переваг. Перш за все тому, що він дає кінцевий біологічний результат без урахування проміжних ланок. Визначаючи, наприклад, тестостерон у крові, ми не маємо гарантії реалізації біологічного ефекту, оскільки можуть «не спрацювати» усі проміжні ланки, необхідні для реалізації дії андрогену. Прикладом цього можуть бути клінічні спостереження над андрогенною недостатністю при досить високому рівні тестостерону.

## **2. Антиандрогени (коротка характеристика, класифікація, медичне застосування)**

Різноманітність та значущість фізіологічних функцій, які контролюються чоловічими статевими гормонами, визначають необхідність корекції андрогеннасиченості тканин не тільки при гіпо-, але і при гіперандрогеніях.

Як відмічено у першому розділі, компенсація недостатньої забезпеченості організму чоловічими статевими гормонами досягається шляхом замісної терапії, для чого використовується широкий спектр речовин з андроген-анаболічними властивостями. Навпаки, у тих випадках, коли мають місце ознаки гіперандрогенізації, застосування знаходять функціональні антагоністи чоловічого статевих гормону та його метаболітів – так звані антиандрогени. «Антиандрогени – це сполуки, які перешкоджають прояву активності андрогенів» (Dorfman, 1970).

Із такого визначення витікає, що медичне призначення антиандрогенів має сенс у тих випадках, коли, як у чоловічому, так і в жіночому організмі спостерігаються симптоми гіперандрогенії. До таких станів відносять прискорене статеве дозрівання, гіперсексуальність, гіпертрофію і рак передміхурової залози у чоловіків, андрогензалежну алопецію, гірсутизм та інші ознаки вірилізації у жінок, юнацькі вугри, себорею у представників обох статей.

Деякі з названих патологій (вугри, себорея, гірсутизм, облісіння) не загрожують здоров'ю та життю, хоча негативно впливають на психологічний стан людини. Інші, наприклад, вірилізм



часто лишає жінку безплідною, а андрогензалежні пухлини передміхурової залози значно скорочують тривалість життя у чоловіків. Так, раку передміхурової залози належить друге місце серед причин смерті чоловіків до п'ятдесяти років і перше місце серед чоловіків після шістдесяти п'яти. Традиційні підходи до лікування вказаних тяжких хвороб полягають у хірургічному втручанні з наступним лікуванням естрогенами, здатними пригнічувати андрогензалежний ріст передміхурової залози, хоча застосування естрогенів у чоловіків часто викликає ускладнення з боку серцево-судинної системи, аж до інфарктів, тромбоемболій та летального кінця.

Із вищесказаного стає зрозумілим, наскільки важливою є проблема пошуку нових речовин, здатних нейтралізувати патогенний вплив чоловічих статевих гормонів на передміхурову залозу та інші андрогенчутливі тканини. Саме із створенням нових високоефективних блокаторів дії чоловічого статевого гормону пов'язують у всьому світі надію на успіх у боротьбі з онкохворобами органів репродуктивної системи у чоловіків та жінок, на розробку косметичних засобів, що нормалізують стан шкіри та її придатків при андрогензалежних патологіях.

Сучасні уявлення про біодинаміку андрогенів в організмі, як відмічають О.Г.Резніков та С.В.Варга (1988), дозволяють теоретично припустити можливість блокади андрогенного впливу на андрогенчутливі тканини шляхом гальмування біосинтезу і секреції андрогензв'язуючих білків крові, інгібування утворення в клітинах-мішенях 5 $\alpha$ -дигідротестостерону та інших біологічно активних метаболітів тестостерону, блокади рецепторів андрогенів в андрогенчутливих тканинах, порушення транслокації андроген-рецепторного комплексу в ядрах клітин та їх взаємодії з акцепторними місцями на хроматині, прискорення метаболічної інактивації та виведення андрогенів з організму.

Сьогодні антиандрогенні властивості, що реалізуються через вказані вище механізми, визначені для великої кількості речовин як природного, так і штучного походження. У таблиці наведена класифікація відомих антиандрогенів відповідно до їх хімічної природи та фізіологічної дії (А.Г.Резніков, С.В.Варга, 1988). Ця класифікація повинна прийматися до уваги розробниками нових антиандрогенів для того, щоб при проведенні тестування нової сполуки на специфічні властивості були застосовані оптимальні підходи та визначені необхідні фізіологічні параметри.

Оскільки дія антиандрогенів та характер їх клінічного застосування дуже різноманітний, об'єм специфічних ефектів, котрі вивчаються при тестуванні речовини на антиандрогенну активність, у кожному окремому випадку може бути різним. Останнє залежить передусім від того, чи стоїть задача встановити механізми антиандрогенної дії у нової сполуки та знайти небажані та шкідливі ефекти. До останніх, наприклад, відносяться антигонадотропні та антистероїдні властивості деяких стероїдних антиандрогенів, що призводить до розвитку типового кастраційного синдрому внаслідок згасання внутрішньосекреторної та сперматогенної функції сім'яників.

З іншого боку, оскільки спектр методичних підходів для доведення антиандрогенної активності речовин достатньо великий, у кожному конкретному випадку при проведенні скринінгових досліджень слід приймати до уваги кваліфікаційний склад групи дослідників (їх спеціалізацію, досвід), можливості експериментальної бази, в тому числі, наявність окремих видів лабораторних тварин, об'єм фінансових витрат та той проміжок часу, що знадобиться для проведення роботи.

Разом з тим певний об'єм досліджень, що дозволять зробити висновок про наявність у нової сполуки антиандрогенних властивостей, повинен виконуватись завжди.

Нижче описані конкретні методики, що складають перелік обов'язкових і застосовуються найбільш часто. До викладення конкретних методик вважасмо за необхідне додати деякі положення загального характеру:

1. Оскільки антиандрогени для системного та топічного (місцевого) застосування мають рівнозначний клінічний інтерес, не слід обмежуватися при вивченні антиандрогенних ефектів одним шляхом введення. Останнє може призвести до втрати цінної інформації відносно перспективності створеної сполуки. Наприклад, аналог відомого нестероїдного антиандрогену

## Класифікація антиандрогенів (А.Г.Резников, С.В.Варга, 1988)

I. За хімічним складом	
<p><b>А. Нестероїдні антиандрогени</b></p> <ol style="list-style-type: none"> <li>1. Заміщені карбоксаніліди: флутамід (Sch 13521, ніфтолід), гідроксифлутамід (гідроксиніфтолід), Ru 23908 (анандрон), Ru 22930, AA 560</li> <li>2. Стероїдоподібні речовини і секостероїди: Ro 5-2537; Ro-2-7239, дигідроізостенол та ін.</li> <li>3. Лікарські засоби та сполуки різної хімічної структури та походження: DIMP, циметидин, ферулієва кислота, перміксон, каннабінол та ін.</li> </ol>	<p><b>Б. Стероїдні антиандрогени</b></p> <ol style="list-style-type: none"> <li>1. Прогестини та їх похідні: прогестерон, ципротерон, ципротерону ацетат, хлормадінонацетат, медроксипрогестеронацетат, 11-гідроксипрогестерон (Sch 12600), мегестролацетат</li> <li>2. Похідні андрогенів: А-нортестостерон, ВОМТ, 3-гідрокси-А-нортестостерон, 17<math>\alpha</math>-метил-<math>\beta</math>-нортестостерон, теслак, TSAА-291 та його аналоги, 17<math>\alpha</math>-пропілтестостерон (топтерон)</li> <li>3. Естрогени: 17<math>\alpha</math>-естрадіол, етинілестрадіол, діетилстильбестрол, синестрол та ін.</li> <li>4. Спіронолактони: верошпірон, альдактон</li> </ol>
II. За фізіологічною дією	
<p><b>А. Блокатори рецепторів андрогенів</b></p> <ol style="list-style-type: none"> <li>1. Блокатори рецепторів андрогенів ("чисті" антиандрогени): флутамід (ніфтолід) та їх похідні, Ru 23908, Ru 22930, AA 560, DIMP, ципротерон</li> <li>2. Антиандрогени комбінованої дії (здатність блокувати рецептори андрогенів у сполученні з антигонадотропною або анти 5<math>\alpha</math>-редуктазною активністю): похідні прогестинів та андрогенів</li> </ol>	<p><b>Б. Сполуки, що впливають на секрецію, транспорт та метаболізм андрогенів</b></p> <ol style="list-style-type: none"> <li>1. Блокатори біосинтезу та секреції гіпоталамічних гонадотропін-релізінг-гормонів та гіпофізарних гонадотропінів: прогестини, естрогени</li> <li>2. Інгібітори біосинтезу андрогенів: аміноглутетимід, ціантриметінандростенолон, естрогени</li> <li>3. Інгібітори 5<math>\alpha</math>-редуктази тестостерону: естрогени, прогестини, 4-андростан-3-он-17<math>\beta</math>-карбонова кислота</li> <li>4. Стимулятори біосинтезу тестостерон-естрадіол-зв'язуючого глобуліну плазми крові: естрогени, тироїдні гормони</li> <li>5. Стимулятори катаболізму андрогенів в організмі: кататоксичні стероїди, барбітурати і т. ін.</li> </ol>

флутаміду Ru-22930 при системному введенні не пригнічує тестостеронстимульованого росту вентральної долі передміхурової залози кастрованих щурів, в той же час при трансдермальному введенні він ефективно блокує стимулюючий вплив тестостерону пропіонату на андрогензалежні процеси в дериватах шкіри (сальні залози, волосяні фолікули). Відсутність антиандрогенних властивостей у Ru-22930 при системному введенні, на думку J.P.Raupauld et al. (1977), обумовлена його швидким знешкодженням у печінці.

2. Антиандрогени знаходять широке застосування при терапії різноманітних гормонзалежних патологій як у чоловіків, так і у жінок. Естрогени та прогестини самі по собі є активними антагоністами чоловічих статевих гормонів, що суттєво впливає на антиандрогенний ефект штучних антиандрогенів. Останнє зумовлює необхідність проведення скринінгових досліджень як на самцях, так і на самицях.

3. Оскільки клінічна потреба в застосуванні антиандрогенів часто пов'язана з патологіями, що виникають у період статевого дозрівання (юнацькі вугри, себорея) або згасання статевої функції (гіпертрофія та рак передміхурової залози), коли в здоровому організмі має місце нестатильність гормонального фону та різна інтенсивність процесів метаболізму, суттєвим є проведення скринінгових досліджень на тваринах різного віку, в тому числі пубертатного періоду та старшої вікової групи.

4. Результати скринінгових досліджень на культурах тканин та в безклітинних системах, що дуже популяризуються закордонними дослідниками, у багатьох випадках не співпадають з даними, отриманими в умовах цілісного організму, а значить, не можуть служити абсолютним доказом наявності антиандрогенних властивостей у речовини, яка тестується.

У той же час, вивчення антиандрогенних властивостей речовин через їх внесення в живиль-

не середовище, де інкубують патологічно перероджені органи та тканини, отримані субопераційно (наприклад, при гіпертрофічній чи онкопереродженій передміхуровій залозі), дозволяє оцінити антиандрогенні можливості речовин та препаратів щодо патологічно зміненого органу. У такий спосіб, наприклад, певною мірою можна моделювати вплив антиандрогену на передміхурову залозу при перектальному введенні препарату.

## **2.1. Методи визначення антиандрогенної активності**

### *2.1.1. Визначення антиандрогенної активності при системному введенні сполук*

#### Тест на самцях щурів та мишей

Класичний тест на кастрованих самцях щурів. Тест розроблено L.O.Randall та J.J.Selitto (1958) та модифіковано R.I.Dorfman і D.Stevens (1960).

Кастровані самці щурів масою близько 100 г, починаючи з 1-го тижня після операції, отримують протягом 7 днів різні дози речовини, яка тестується. Водночас тваринам вводять 0,1 мг тестостерону пропіонату (ТСП), щоденно, підшкірно. Тварин піддають евтаназії на 8-ий день, виділяють та зважують сім'яні пухирці, передміхурову залозу, т. л. а. Слід зазначити, що більшість дослідників вважають за необхідне вводити тваринам 0,1 мг (100 мкг) ТСП, оскільки, на їх думку, стимулюючий ефект 26 мкг ТСП, як це робили R.I.Dorfman і D.Stevens, дуже низький.

Можна застосувати модифікацію методу, описаного вище, яка полягає в тому, що кастрованим тваринам кількох груп (вік тварин та спосіб введення речовин ті ж самі) вводять різні дози ТСП (на добу від 0,03 до 1 мг на тварину), які комбінують з введенням 3 та 1 мг відомого андрогену або того, що вивчається. Виразно виявляється дозозалежне збільшення маси СП та ВПЗ під впливом ТСП, а також дозозалежний андрогенінгібуючий ефект відомого або нового антиандрогену. Наприклад, дія 0,1 мг ТСП майже повністю пригнічується 3 мг ципротерону ацетату (ЦПА) як в СП, так і у ВПЗ. З підвищенням дози ТСП інгібуючий ефект ЦПА зменшується. Цей метод зручний для вивчення однієї субстанції, але громіздкий при встановленні антиандрогенної активності у кількох сполук. Найбільш раціональним є його застосування для встановлення діапазону ефективних доз, оскільки при цьому субстанція, що вивчається, витрачається економно.

Визначення антиандрогенних ефектів на інтактних самцях щурів (R.Kassenaar, 1960; F.Neumann, 1961): інтактним дорослим самцям вагою 280–300 г кожного дня вводять антиандроген у дозі від 10 до 1 мг/доб протягом 12 днів. Отримані дані відтворюють дозозалежний вплив антиандрогену на СП. Цей метод дозволяє визначити, чи здатна сполука, що тестується, пригнічувати ефект ендогенного тестостерону, хоча при його використанні не можна відповісти на питання, який механізм антиандрогенного впливу: чи це результат трансгіпофізарного пригнічення продукції тестостерону в сім'яниках підслідних тварин, чи ефект розвивається внаслідок конкурентних відношень речовини, яка вводиться, з ендогенним гормоном на рівні цільових тканин. Сполуки, що мають сильний інгібуючий ефект на центральну ланку регуляції синтезу андрогенів (наприклад, естрогени), проявляють ефекти справжніх антиандрогенів при такій постановці дослідження.

При застосуванні цього методу треба обов'язково проводити визначення рівня ендогенного тестостерону у тварин до та після введення сполуки, що випробовується, а за наявності зниження рівня гормону після введення нової сполуки необхідно провести дослідження гонадотропної функції гіпофіза.

#### Вивчення антиандрогенної активності нових сполук на самцях мишей

Статевозрілих тварин (маса 30–40 г) каструють і, починаючи з наступного дня, їм вводять підшкірно 0,03 мг ТСП протягом 7 днів, комбінуючи андроген з різними дозами сполуки, що тестується. Тварин піддають евтаназії на 8-ий день, відокремлюють та зважують СП і ВПЗ. Перевагою методу є невеликі витрати ТСП та нових речовин.

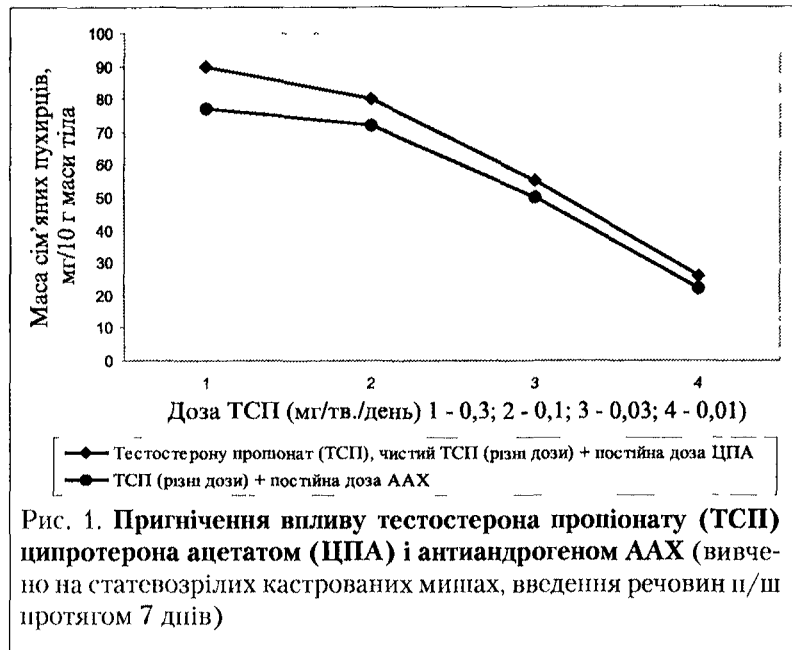


Рис. 1. Пригнічення впливу тестостерона пропінату (ТСП) ципротерона ацетатом (ЦПА) і антиандрогеном ААХ (вивчено на статевозрілих кастрованих мишах, введення речовин п/ш протягом 7 днів)

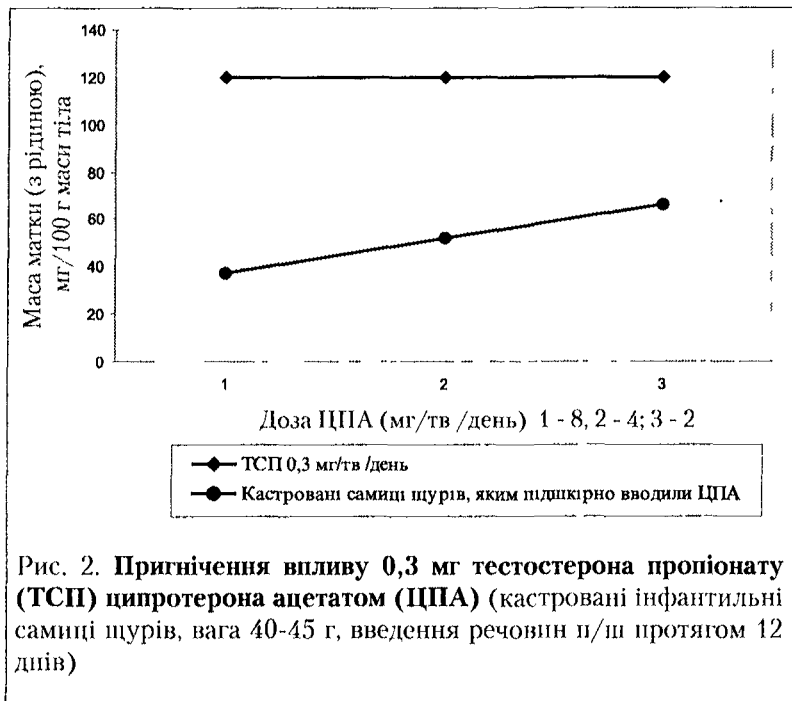


Рис. 2. Пригнічення впливу 0,3 мг тестостерона пропінату (ТСП) ципротерона ацетатом (ЦПА) (кастровані інфантильні самиці щурів, вага 40-45 г, введення речовин п/ш протягом 12 днів)

Тест на самицях щурів та мишей

З метою визначення антиандрогенної активності нових сполук використовують не тільки самців, але й самиць, у яких критерієм антиандрогенної активності є пригнічення росту матки та препуціальних залоз, викликане введенням ТСП. Дослідження проводять на кастрованих та інтактних інфантильних тваринах.

У першому випадку статевонезрілих самиць щурів каструють. Підшкірні введення сполуки, що тестується, починають через 7 днів. Тваринам п/ш вводять також постійну (0,3 мг) дозу ТСП, комбінуючи її з різними дозами нової речовини. Введення продовжується 12 днів. Щурів піддають евтаназії на 13-ий день, видаляють і зважують матку (з рідиною та без), препуціальні залози. На рисунку 2 наведені результати такого експерименту. Прогір між двома лініями відображає ріст маси матки під впливом введення ТСП. З графіка видно,

Модифікація методу може полягати в тому, що доза ТСП змінюється, а доза антиандрогену, який вивчають, лишається постійною. Такий підхід зручний для візуального порівняння антиандрогенної активності кількох речовин, взятих в однаковій кількості (рис. 1). Графік яскраво демонструє значно більші антиандрогенні можливості ЦПА, ніж речовини ААХ.

Тест на інтактних мишах, як і на інтактних щурах, теж використовують для тестування антиандрогенної активності. Але досвід показує, що за цих умов для досягнення повного пригнічення впливу ендогенних андрогенів необхідна значна доза антиандрогену. Механізм антиандрогенного впливу при цьому лишається нез'ясованим; вихідні рівні тестостерону в окремих особин можуть значно коливатися, що вносить похибку в отримані результати. Ось чому використання інтактних мишей в скринінгових дослідженнях недоцільне.

Деякі автори, намагаючись скоротити тривалість експерименту, використовують як тест-об'єкт статевозрілих кастрованих самців щурів масою 35-40 г. При цьому введення агоністів та антагоністів андрогенів починають з наступного дня після кастрації і продовжують 8 днів (L.J.Lerner et al., 1960; Т.В.Іваненко, 1978).

що речовина, котра досліджується (ЦПА), дозозалежно знижує масу матки. При одночасному введенні ТСП та 8 мг ЦПА повністю інгібується ефект чоловічого статевого гормону.

У модифікованому варіанті цієї методики тваринам вводять різні дози ТСП та постійну дозу антиандрогену. Як і аналогічні експерименти на самцях, даний підхід дозволяє провести порівняльну оцінку антиандрогенної активності кількох речовин з відомим антиандрогеном.

Антиандрогенна активність може бути досліджена на інтактних інфантильних самицях щурів. При цьому тваринам масою 40–45 г вводять 0,3 мг ТСП протягом 12 днів, комбінуючи його з введенням різним групам тварин певних доз нової речовини.

Тест на інфантильних самицях щурів, як інтактних, так і кастрованих, дуже зручний, оскільки його легко виконати, тест достатньо чутливий і дає невелику похибку. Навпаки, тест з самицями мишей менш придатний для використання.

Слід відмітити, що за будь-якої постановки експерименту з визначення наявності інгібуючого ефекту у нових сполук обов'язково потрібна контрольна група тварин (інтактних або кастрованих, залежно від обраної методики), яким в аналогічному режимі вводять відповідні об'єми розчинників.

Описані вище тести, які базуються на визначенні вагових показників органів-мішеней у тварин, що отримували агоністи або антагоністи статевих гормонів, дозволяють охарактеризувати антиандрогенний ефект речовини, що тестується, не тільки графічно, а й у числовому вигляді. З цією метою користуються так званим відсотком інгібуючого ефекту (ІЕ), який підраховують за формулою:

$$IE (\%) = \frac{M_{K1} - M_{on}}{M_{K1} - M_{K2}} \cdot 100, \quad 2.1$$

де  $M_{K1}$  – маса органу при введенні андрогену;

$M_{on}$  – маса органу при одночасному введенні андрогену та антиандрогену;

$M_{K2}$  – маса органу при введенні розчинника.

Деякі автори паралельно для оцінки міотрофічної дії речовин, що досліджуються, користуються т.зв. міотрофічним індексом (МІ), який підраховують за формулою:

$$MI = \frac{\text{відносна маса т. л. а.}}{1/2 (\text{відносна маса СП} + \text{ВП})} \quad 2.2$$

#### Тест з плодами самців щурів

До тестів, які дозволяють визначити антиандрогенну активність у тієї чи іншої речовини шляхом оцінки змін у андрогензалежному диференціюванні органів, належить тест з плодами самців щурів, у яких внаслідок введення вагітним самицям антиандрогенів у критичному періоді диференціації органів репродуктивної системи (з 17 по 22 дні вагітності) настанє фемінізація останніх. Ознаки цих змін можна спостерігати шляхом виготовлення сагітальних зрізів з плодів 22-го дня розвитку та оцінки таких параметрів, як аногенітальна відстань та довжина уретри. Необхідно зауважити, що, як виявилось, плоди самців кролів більш чутливі до введення антиандрогенів самицям, ніж плоди самців щурів.

У зв'язку з цим F. Neumann et al. (1980) запропонували проводити гістологічне вивчення поперечного зрізу фалоса плодів кролів, отриманих від самиць, яким вводили антиандрогени, оцінюючи ступінь розвитку та особливості розташування щодо нього препуціальних залоз. При певних навичках у роботі з плодами вищеописані тести можуть бути успішно застосованими.

#### *2.1.2 Виявлення антиандрогенної активності при точічному нанесенні досліджуваних речовин*

Пагогенетичні механізми виникнення андрогензалежних хвороб шкіри та її придатків обумовлюють інтерес до створення антиандрогенів з виразною специфічною активністю

при локальному нанесенні на місце ураження. Зараз добре відомо, що механізми впливу антиандрогенів на процеси в шкірі можуть бути різними і що виразні антиандрогенні властивості, притаманні речовині при системному введенні, не завжди зберігаються при топічному нанесенні і навпаки. Ось чому, з нашої точки зору, всі сполуки, що тестуються на наявність антиандрогенної активності, повинні перевірятися і в тестах з топічним застосуванням.

При пошуку речовин, котрі мають виразну місцеву антиандрогенну активність, постає питання про використання адекватних тест-об'єктів.

Таким андрогензалежним органом, що локалізується в шкірі, є косто-вертебральний або боковий орган у золотавих хом'ячків. Саме це утворення використовують як тест-об'єкт при випробуванні речовин на наявність у них антиандрогенних властивостей при зовнішньому застосуванні.

У молодих статевозрілих самців боковий орган добре розвинутий, знаходиться в косто-вертебральному куті (з проєкції спини), має вигляд чітко окресленої темної плями. Гістологічно це утворення сформоване складними сальними залозами, зануреними у власне дерму та оточеними сполучно-тканинною оболонкою. Ацинуси залоз складаються з клітин полігональної форми, які достатньо щільно лежать одна біля одної. Цитоплазма клітин злегка зерниста, ядра крупні, мають велику кількість пухкого хроматину. В клітинах вивідних протоків сальних залоз інтактних тварин накопичується значна кількість темного пігменту. Про андрогенну залежність органу свідчить його різка атрофія при двобічній кастрації та відновлення структури після компенсаторного введення ТСП. Необхідно зазначити, що вказане утворення є і у самиць, але у інтактних статевозрілих особин воно розвинуто недостатньо. Введення самицям екзогенних андрогенів стимулює ріст та секрецію сальних залоз у складі бокового органу. Останнє використовується окремими дослідниками при тестуванні антиандрогенних речовин на самицях хом'ячків (Л.В.Чайковская, 1993).

Для вивчення антиандрогенних властивостей речовин при топічному нанесенні дію антиандрогенів частіше за все випробовують на одному із бокових органів. При цьому другий, на який наносять розчинник, служить за контрольний для визначення системної дії препарату. Режим нанесення, одноразова та сумарна доза речовини, а також розчинники можуть бути різними. Стандартна постановка досліду (A.Weissmann et al., 1985) полягає у розподілі тварин, яких використовують, на декілька груп. При цьому одну групу тварин (3–4 тв.) каструють і залишають на період проведення досліджень без будь-якого впливу. Іншим (погрупно) на очищений від волосяного покриву боковий орган з однієї сторони наносять речовину, що тестується, в кратних дозах (наприклад, для прогестерону – 0,03 мг, 0,3 мг та 3 мг у 5% ізотонічному розчині). Слід звернути увагу на необхідність нанесення невеликих об'ємів та застосування запобіжних заходів для забезпечення повного всмоктування нанесеної дози. На протилежний бік наносять такий же об'єм розчинника. У декількох тварин контрольну сторону лишають недоторканою.

Вибір розчинника – це вельми важлива справа. Так, F.Neumann (1980), порівнюючи результати нанесення прогестерону в суміші бензил-бензоат – касторова олія (1:10) в диметилсульфоксиді та диметилацетаміді, пересвідчився в тому, що кращим розчинником для прогестерону є перша суміш, оскільки вона забезпечує максимум специфічного ефекту. Диметилсульфоксид, хоча і є дуже гарним розчинником для стероїдів, практично повністю пригнічує антиандрогенну активність прогестерону.

Під час нанесення препарату на боковий орган регулярно (наприклад, раз на тиждень) вимірюють поздовжній та поперечний діаметри пігментної плями усіх тварин. Після завершення експерименту хом'ячків забивають, бокові органи відокремлюють, зважують. Також виділяють та зважують сім'яні пухирці та передміхурову залозу (якщо експеримент проводиться на самцях). Плазму крові тварин використовують для визначення рівня ендогенних андрогенів та гонадотропних гормонів (при можливості).

Очищені від жирової тканини бокові органи фіксують у рідині Карнуа і заливають у парафін. Серійні 10-мікронні зрізи фарбують гематоксилін-еозином і проводять гістологічне дослідження та морфометричну оцінку окремих структур. Об'єм органу визначають шляхом комп'ютерної планіметрії (A.Weissmann et al., 1984).

Відсутність статистично вірогідного зменшення органу на контрольному боці, а також незмінність маси сім'яних пухирців та передміхурової залози свідчать про брак системної дії у речовини, яка тестується. І, навпаки, зниження вагових показників сім'яних пухирців і передміхурової залози та редукція сальних залоз у боковому органі на протилежному боці від нанесення антиандрогену вказують на системний вплив сполуки, котра вивчається.

Особливості роботи з самицями золотавих хом'ячків полягають у необхідності проведення андрогенної стимуляції їх бокових органів. Антиандрогенний ефект нових сполук визначається на тлі такої стимуляції. З нашої точки зору, заслуговує на увагу постановка експериментів, здійснена Л.В.Чайковською (1993): самицям сірійських хом'ячків (маса тіла 130–160 г) вводили внутрішньом'язово 1 мг тестенату (80% тестостерону енантату та 20 % тестостерону пропіонату) у вигляді 1% масляного розчину один раз у 15 днів. Розчини ніфтоліду та гідроксиніфтоліду (1,2% та 4%), які випробовували, наносили на правий бік по 0,025 мл двічі на день (вранці та ввечері) протягом 30 днів. Розчинником була суміш етанолу з 1,2-пропіленгліколем (2:1). Контрольні тварини отримували на лівий боковий орган один розчинник у відповідному об'ємі або тестенат + розчинник. Через 12 годин після останньої аплікації розчинника тварин забивали, визначали діаметр та масу обох бокових органів порівняно з інтактними тваринами. Відмітили, що аплікація антиандрогенів викликала виразне гальмування стимулюючого впливу екзогенних андрогенів, при цьому мав місце дозозалежний ефект. Для визначення системної дії досліджуваних антиандрогенів проводили контроль маси матки та яєчників. Введення тестостерону самицям призвело до суттєвого зниження відносної маси матки та яєчників; антиандрогенного ефекту щодо цих органів у ніфтоліду не було знайдено.

Слід зазначити, що місцеві (локальні) антиандрогенні ефекти притаманні як стероїдним, так і нестероїдним антиандрогенам. Ступінь виразності топічного впливу при цьому залежить як від природи речовини, так і від дози, тривалості нанесення, розчинника, базового гормонального фону та від багатьох інших факторів.

Від цих же умов, а також від здатності всмоктуватися, метаболізуватися в печінці та впливати на гіпоталамо-гіпофізарно-гонадну вісь залежить наявність системних ефектів у антиандрогенів.

Треба пам'ятати також про те, що дотепер не створено ефективного антиандрогену, який мав би тільки місцеві ефекти. Все залежить від вказаних обставин.

Підсумовуючи вищевикладене, необхідно підкреслити, що для того, щоб запропонувати сполуку з встановленими у скринінгових тестах антиандрогенними властивостями, необхідно в подальшому провести ряд спеціальних досліджень, серед яких – визначення рівня гормонів, вплив сполуки на себогенез у сальних залозах, вплив на стан волосяних фолікулів та ріст волосся, визначення впливу речовини на синтез білків та нуклеїнових кислот в тканинах-мішенях андрогенів, здатність специфічно зв'язуватися з андрогенними рецепторами в таргетних тканинах, вплив на ферменти та концентрацію лимонної кислоти в передміхуровій залозі, здатність пригнічувати метаболічні та ростові процеси в патологічно перероджених андроген-залежних органах *in situ* та *in vitro* і багато іншого.

Тільки всебічна оцінка сполуки з встановленими у скринінгових дослідженнях антиандрогенними властивостями дозволить правильно оцінити її перспективність, визначити напрямок подальшого фармакологічного дослідження та клінічного застосування.

**Література**

1. Андрогены и антиандрогенная терапия/Под ред. С.Л.Джеффкоута.– М.: Медицина, 1985.– 232 с.
2. Гелла И.М., Сергиенко Л.Ю., Черевко А.Н.//Хим.-фарм. журн.– 1990.– Т.24, №12.– С. 29–31.
3. Иваненко Т.И.//Пробл. эндокринологии.– 1978.– №4.– С. 86–91.
4. Резников А.Г., Варга С.В. Антиандрогены.– М.: Медицина, 1988.– 208 с.
5. Вартанетов Б.А., Демченко А.Н. Предстательная железа и возрастные нарушения половой деятельности.– К.: Здоров'я, 1975.– 214 с.
6. Brown I.B., Rothwell S.W.//Steroids.– 1981.– V.37, №6.– P. 635–648.
7. Dorfman R.I., Stevens D.//Endocrinol.– 1960.– V.67.– P. 394.
8. Dorfman R.I.//Br. J. Dermatol.– 1970.– V.82 (Suppl. 6)– P. 3–8.
9. Girard J., Barbier A. Lafitole C.//Arch. Dermatol. Res.– 1980.– V.269.– P. 281–290.
10. Kassenaar R., Querido A., Scholer H.F.//Acta Endocrinol.– 1960.– V.51.– P. 895.
11. Lerner L.J., Bianchi A., Borman A.//Acta Endocrinol.– 1960.– V.51.– P. 869.
12. Neumann F. Methods for evaluating antisexual hormones//Methods in drug evaluation/Eds P.Mantegarra, F.Piccini.– 1966.– P. 548–573.
13. Neumann F., Schleusener A., Albring M. Pharmacology of antiandrogens//Androgenation in women//Eds J.Hammerstein, V.Lachnit-Fixon, F.Neumann, G. Plewig.– 1980.– P. 147–192.
14. Randall L.O., Selitto J.J.//Endocrinol.– 1958.– V.62.– P. 693.
15. Vermorken A.J.M., Goos C.M., Roclofs M.M.//Br. J. Derm.– 1980.– V.102.– P. 455–460.
16. Weissmann A., Bowden J., Frank B.L. et al.//Arch. Dermatol.– 1985.– V.121.– P. 57–62.



## ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНЕ (ДОКЛІНІЧНЕ) ВИВЧЕННЯ ЛІКАРСЬКИХ ПРЕПАРАТІВ, ЩО ВПЛИВАЮТЬ НА МУСКУЛАТУРУ МАТКИ

Дроговоз С.М.,  
Риженко І.М.,  
Зайченко Г.В.,  
Цишкун А.Г.

Однією з важливих задач сучасного акушерства, яка спрямована на зниження материнської і перинатальної захворюваності та смертності, є розробка та впровадження у клінічну практику високоефективних лікарських засобів для боротьби з порушеннями скорочувальної діяльності матки (СДМ). У вирішенні цієї проблеми важливе місце відводиться:

- токолітикам – препаратам, що пригнічують СДМ під час вагітності і пологів;
- утеротонікам – препаратам, що стимулюють СДМ.

Використання у комплексній терапії невиношування вагітності та боротьби з погрожуючими передчасними пологамі токолітичних засобів виключно закордонного виробництва, які лише частково задовольняють запити практичного акушерства, а також відсутність вітчизняних утеротоніків і утеролітиків ставить перед дослідниками за мету цілеспрямований пошук біологічно активних речовин (БАР) такого типу активності і розробки на їх основі конкурентоспроможних засобів.

Ці методичні рекомендації є документом, який характеризує сучасні методи експериментального вивчення та аналізу впливу речовин на СДМ, визначає параметри доклінічних досліджень БАР з потенційною токолітичною і утеротонічною дією.

### 1. Особливості вивчення СДМ в експерименті

Експериментальні дослідження з вивчення особливостей СДМ включають: проведення дослідів на клітинному та організмі рівні, а також на цілісному організмі. Перші два рівні передбачають експерименти *in vitro*, останній – *in situ* та *in vivo*.

**Дослідження *in vitro*.** Ізольовані препарати гладеньких м'язів широко застосовуються при скринінгу різних БАР, у тому числі діючих на скорочення міометрія. Це пов'язано з тим, що у процесі філогенезу гладеньком'язові клітини піддаються лише мінімальній диференціації, внаслідок чого специфічна потреба у кисні у них невелика. Крім того, за цих умов відсутній вплив на ізольований препарат регуляторних та гуморальних факторів, які діють на функцію органу [1].

Однією з умов вивчення СДМ є дотримання режиму гладеньком'язового скорочення: ізотонічного, ізометричного або ауksотонічного [1]. Для одержання однотипних кривих скорочення та порівняльних результатів експерименту велике значення мають: постійність довжини та поперечного розрізу препарату з гладеньких м'язів, його натягу, склад та температура омиваючого розчину, час інкубації, вид тварини, наявність спонтанної скорочувальної активності, стадія естрального циклу, наявність вагітності та її термін, циркадні ритми.

Вірогідні результати отримують на смужках міометрія вагітних білих щурів перед пологамі (20–22 день вагітності), оскільки матка напередодні пологів має спонтанну скорочувальну активність у 98% випадків [2], а також невагітних щурів, що вже народжували, в стадії спокою

(дієструс). Фазі дієструсу при дослідженні утеротропної активності віддають перевагу як фази відносного гормонального спокою у статевому циклі самок. Якщо не дотримуватися цих умов, то для статистичної обробки одержаного матеріалу потрібно використання значної кількості тварин. Суттєвий інтервал статистичних даних відмічається у дослідах *in vitro* на міометрії мурчаків та кролиць.

Однією з переваг цього методу дослідження є його мала вартість порівняно з дослідями *in situ* та *in vivo*. Так, з рогів матки одного щура, що містить 10–12 плодів, можна приготувати 15–20 гладеньком'язових препаратів і випробувати понад 10 хімічних сполук. Крім того, матка являє «універсальний» об'єкт з багатим рецепторним апаратом, що дає змогу отримати максимальну інформацію при скринінгу нових БАР. Експерименти на ізольованому препараті матки найбільш оптимальні для одночасного вивчення її електричної і скорочувальної активності при подсианні механоелектричних перетворювачів з поза- та внутрішньоклітинним відведенням біопотенціалів за допомогою електродів тиску [3].

**Дослідження *in situ*.** В експериментах *in situ*, як правило, проводиться реєстрація скорочувальної активності матки за допомогою механотрона. Однак можливий одночасний запис скорочувальної і електричної активності міометрії. Останній здійснюється тільки шляхом позаклітинного відведення біопотенціалів електродами тиску. За даними [3], інформація, одержана при вивченні лише електричної активності, не пояснює повністю нюанси фазності маткових скорочень і не дає уявлення про різноманітні енергетичні особливості гладеньком'язових скорочень міометрії.

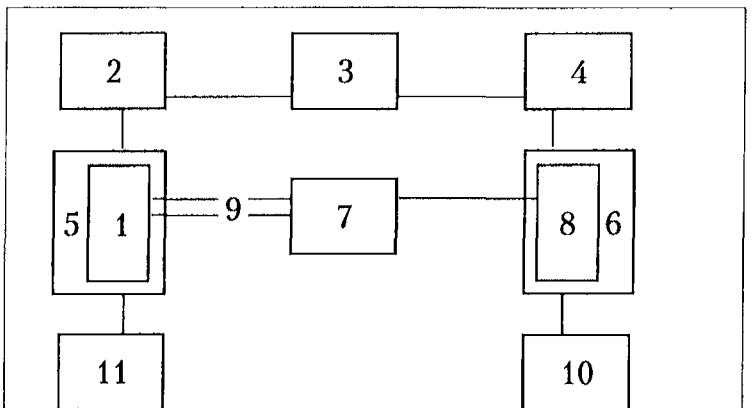
Позитивним аспектом дослідів *in situ* є участь нейрогуморальних факторів у регуляції скорочувальної діяльності міометрії, що дає можливість використовувати їх для поглибленого вивчення. Водночас, метод має велику вартість, оскільки дозволяє вивчити на одній тварині лише одну дозу речовини.

**Дослідження *in vivo*.** Перевага даного методу полягає у тому, що він дає змогу вивчити утеротропні властивості речовин у хронічному експерименті з використанням різноманітних методик: внутрішньої балонної утерографії, маткової фістули, вживлених тензометричних датчиків, шкірноматкового містка.

## 2. Методика вивчення СДМ

Вивчення СДМ (*in vitro*, *in situ*, *in vivo*) проводяться на спеціальному обладнанні за допомогою механотропів. Вихідний сигнал механотрона подається на вихід посилювача, а з нього – на відхиляючі пластинки електронно-променевої трубки осцилографа. Гістерограми записуються на реєструючому приладі. У дослідах на ізольованому міометрії температура перфузуючого розчину підтримується за допомогою ультратермостата, а його подача – за допомогою перистальтичного насоса (рис. 1).

За відсутності такого приладу запис скорочувальної активності матки можна здійснити на стрічці електроміографа. Однак при цьому, зважаючи на достатньо низьку чутливість



**Рис 1. Схема приладу для реєстрації скорочувальної активності матки:**

1 – об'єкт вивчення; 2 – механотрон; 3 – осцилограф; 4 – потенціометр; 5 – двостороння склянка; 6 – ультратермостат; 7 – перистальтичний насос; 8 – посуд з розчином Кребса; 9 – перфузійна трубка; 10 – електротермометр; 11 – посуд для зливу.

реєструючого приладу, результати експерименту можуть бути занижені в 5–7 разів щодо даних, отриманих на приладі, де запис проводиться за допомогою електромеханічних перетворювачів.

### 2.1. Досліди *in vitro*

Для експериментів використовують вагітних щурів і мишей або невагітних щурів, що народжували, у стадії дієструс. Фазу естрального циклу визначають за допомогою мікроскопії піхвових мазків за [11]. Тварин піддають евтаназії, розтинають черево посередині розрізом від лобкового зчленування до грудини і, відсунувши кишечник убік, знаходять матку.

Ізольовані відрізки рогів матки, взяті з організму тварини, ретельно препарують у розчині Кребса, залитому на дні чашки Петрі, попередньо закріпивши їх на парафіні голками з чотирьох кутів. Довжина гладеньком'язових препаратів становить 20 мм, ширина – 4 мм. Потім ізольовані відрізки або смужки міометрія інкубують протягом 1 години у розчині Кребса при  $t=20-22^{\circ}\text{C}$ . Крім розчину Кребса можна використовувати розчин Рингера-Локка, Зунда та ін. [1]. Далі ізольовані відрізки рогів матки або їх смужки поміщають у двосторонню склянку з проточним розчином Кребса ( $t=37^{\circ}\text{C}$ ), аерованим сумішшю газів (95%  $\text{O}_2$  + 5%  $\text{CO}_2$ ), попередньо закріпивши два кінці пренарату на спеціальному фіксаторі з поділками. Фіксатор жорстко закріплюють у горизонтальному положенні паралельно переміщенню рухомої системи датчика механотрона 6 МХ1С або 6 МХ9Б.

Після виникнення спонтанних скорочень матки реєструють фонову гістерограму. Потім БАР у досліджуваній концентрації додають у склянку з гладеньком'язовим препаратом і проводять запис скорочувальної активності матки.

### 2.2. Досліди *in situ*

Тварин (кролиць або білих щурів) наркотизують уретаном і хлоралозою, потім поширово розтинають черевну порожнину. В ділянку розрізу виводять петлю рогу матки і фіксують до спеціальних виступів в середині двостінної склянки аналогічно дослідам *in vitro*. Для щурів використовують скляний циліндр (довжина 40 мм, діаметр 15–20 мм), який вшивають кисетним швом за Миколаєвим-Суботіним, або прижимають до м'язів передньої черевної стінки живота так, щоб розчин, налитий у склянку, не витікав назовні (модифікація за Л.М.Зайцевим).

Ріг матки за допомогою серфінок з'єднують з механотроном, закріпленим на штативі від мікроскопа, натяг міометрія контролюють за зміщенням променя осцилографа. Гістерограми реєструють за допомогою самописця. Речовини, що досліджуються, вводять внутрішньом'язово або в вену: щурам – у яремну або хвостову, кролицям – у крайову вену вуха.

### 2.3. Досліди *in vivo*

Донині методи вивчення утеротропних властивостей фармакологічних речовин у цілісному організмі розроблено недостатньо. За даними літератури, дослідження у гострому досліді під наркозом за методом Миколаєва-Суботіна порушують фізіологічну функцію матки [4]. Спроби ряду авторів використати на цілісній тварині у хронічному досліді такі методи, як шкірно-матковий місток, метод маткової фістули, не знайшли широкого використання через травматичність, можливість інфікування та складність [12]. Серед методів, що дозволяють вести вивчення утеротропної дії речовин у хронічному експерименті без використання наркозу, найбільш придатними є електроутерографія і метод внутрішньої балонної утерографії [5, 6]. Однак існують суттєві обмеження можливості використання методу електроутерографії для дослідження впливу фармакологічних речовин на окремі компоненти скорочувальної активності матки [14].

Пропонується 2 способи використання методу балонної утерографії.

За Л.М.Зайцевим (1991). Стерильний гумовий балончик імплантують оперативним шляхом у просвіт рогів матки кролиць. Відвідну трубку фіксують у ділянці потилиці тварини і з'єднують через трійник із сифоном, що контактує із штирком механотрона на рухомому тримачі. Шприцом у системі балон-сифон утворюють тиск, який передає механотрону силу  $1,96 \cdot 10^{-3} \text{H}$ , яку можна зіставити з величиною напруги міометрія у дослідях *in vitro*. Така система дозволяє реєструвати тиск у будь-якому статевому органі.

За П.І.Сизовим (1992). Оперативним шляхом у просвіт рогів матки кролиць вживлюють гумовий балончик довжиною 1,5 см, з'єднаний з хлорвініловою трубкою діаметром 2 мм. Гумовий балончик вводять у порожнину рогу матки через надріз у його бічній стінці, а потім черевну порожнину зашивають. Трубку від балончика проводять під шкірою, виводять кінець в області потилиці тварини. Досліди починають через 10 днів після операції. Кролицю поміщають до спеціальної клітки, де вона перебуває у природному для неї стані без наркозу. Скорочення рогів матки, здавлюючи балончик, спричиняє коливання внутрішньоматкового тиску (ВМТ), яке вимірюється за допомогою водного манометру. На реєструючому приладі одночасно записують скорочувальну активність рогу матки і коливання ВМТ в мм водного стовпчика (рис. 2).

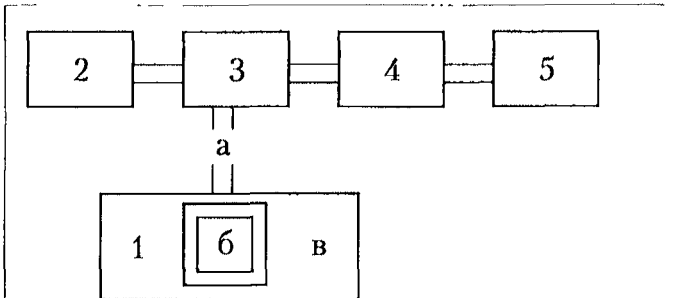


Рис. 2. Схема методу бароутерографії:

1 – спеціальна клітка з тваринами; 2 – водний манометр; 3 – повітряна капсула; 4 – бароперетворювач; 5 – реєструючий прилад. а – трубка, б – балон, в – рог матки.

Про тонус міометрія судять за мінімальним ВМТ під час паузи. Силу маткових скорочень оцінюють за максимальним ВМТ на висоті скорочення, враховують також частоту скорочень.

При бароутерографічному методі індукована балончиком скорочувальна активність матки наближається до ізометричної (силової) скорочувальної діяльності під час пологів (В.Г.Філімонов, 1973) і є аналогією вигнання плода маткою, тоді як електроутерографічний метод дає можливість оцінити спонтанну скорочувальну активність міометрія. Метод бароутерографії як модель скорочувальної активності матки в ізометричному режимі найбільш інформативний при пошуку потенціальних утеролітиків. Він дозволяє проводити дослідження як на невагітних (у фазі дієструса або оваріоектомованих), так і на вагітних кролицях (26–30-й день вагітності).

Речовини можна вводити у 2–3-х дозах внутрішньоплунково, внутрішньом'язово або внутрішньовенно. Кожну дозу препаратів перевіряють на групі тварин (у середньому по 6 особин), контрольна група складася 10–12 кролиць. Тварин контрольної групи присднують до системи приладів, підвищують ВМТ (до 90–100 мм водного стовпчика у невагітних або до 130–140 мм у вагітних) і реєструють вихідну бароутерограму безперервно протягом 3 годин. При внутрішньовенному введенні речовин дослідних тварин зразу присднують до приладів, при внутрішньоплунковому – через 30 хвилин після введення препарату. Як і у контролі, підвищують ВМТ і ведуть безперервну реєстрацію протягом 3 годин. Отримані результати обробляють статистично.

Речовини можна вводити у 2–3-х дозах внутрішньоплунково, внутрішньом'язово або внутрішньовенно. Кожну дозу препаратів перевіряють на групі тварин (у середньому по 6 особин), контрольна група складася 10–12 кролиць. Тварин контрольної групи присднують до системи приладів, підвищують ВМТ (до 90–100 мм водного стовпчика у невагітних або до 130–140 мм у вагітних) і реєструють вихідну бароутерограму безперервно протягом 3 годин. При внутрішньовенному введенні речовин дослідних тварин зразу присднують до приладів, при внутрішньоплунковому – через 30 хвилин після введення препарату. Як і у контролі, підвищують ВМТ і ведуть безперервну реєстрацію протягом 3 годин. Отримані результати обробляють статистично.

### 3. Методи кількісної оцінки скорочувальної функції матки

Існування численних методів реєстрації та математичної обробки гістерограм робить важким оцінку СДМ, що не дозволяє проводити у порівняльному плані аналіз експерименталь-

них даних, отриманих різними дослідниками [9, 10, 14, 16–18].

На гістерограмі під час запису скорочень матки накреслюється крива скорочення-розслаблення міометрія (напівсинусоїда), за якою можна виміряти низку основних і другорядних показників (рис. 3, табл. 1).

Кількісна оцінка гістерограм базується на аналізі горизонтальних і вертикальних параметрів скорочень.

До горизонтальних («часових») параметрів належать:

- тривалість фаз скорочення і розслаблення;
- тривалість інтервалів між скороченнями;
- тривалість самого скорочення і маткового циклу в цілому.

До вертикальних («енергетичних») відносяться: амплітуда, сила і тиск, які в кінцевому результаті, незалежно від того, у якому режимі реєструється скорочення м'язів, відображають єдиний процес актоміозинової взаємодії, у результаті чого відбувається генерація сили і скорочення м'язового волокна з визначеною швидкістю. Сила скорочення, що розглядаєтья як проекція на напрямок переміщення ниток актину і міозину, не завжди пропорційна цьому переміщенню і відображається складною нелінійною функцією часу  $F(t)$  [16, 17].

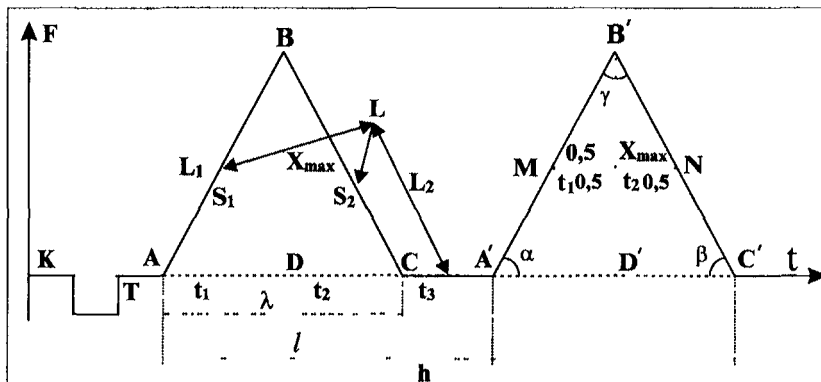


Рис. 3. Схематичне відображення поодиноких маткових скорочень

Таблиця 1

Показники гістерограм (до рис. 3)

№	Позначення	Назва	Одиниця виміру
1.	$X_{\max}$	Максимальна амплітуда (ВД)	м
2.	$t_1$	Час фази скорочення (АД)	с
3.	$t_2$	Час фази розслаблення (ДС)	с
4.	$\lambda$	Тривалість скорочення (АС)	с
5.	$S_1$	Площа фази скорочення (АВД)	м <sup>2</sup>
6.	$S_2$	Площа фази розслаблення (ДВС)	м <sup>2</sup>
7.	$S_1+S_2$	Площа фігури скорочення (АВС)	м <sup>2</sup>
8.	$L_1$	Довжина напівхвилі фази скорочення (АВ)	м
9.	$L_2$	Довжина напівхвилі фази розслаблення (ВС)	м
10.	$L_1+L_2$	Довжина хвилі скорочення (АВС)	м
11.	T	Тонус	Н, Па
12.	$t_3$	Інтервал між скороченнями (СА)	с
13.	$\alpha$	Кут нахилу кривої фази скорочення	град.
14.	$\beta$	Кут нахилу кривої фази розслаблення	град.
15.	$\gamma$	Кут вершини скорочення	град.
16.	l	Тривалість маткового циклу (АА <sub>1</sub> )	с
17.	L	Довжина кривої маткового циклу (АВСА <sub>1</sub> )	м
18.	h	Довжина стрічки гістерограми за досліджуваний проміжок часу (АС)	м

До цього часу при оцінці результатів як експериментальних, так і клінічних досліджень, використовується переважно амплітудно-частотна характеристика гістерограм (монопараметричний підхід). Однак не завжди антагоністи (агоністи) маткових скорочень можуть викликати зміну амплітуди, але при цьому значною мірою здатні впливати на «часові» параметри, від яких залежать «енергетичні» показники СДМ.

У зв'язку з цим для більш точної характеристики утеротропних препаратів монопараметричний підхід є явно недостатнім.

Л.М.Зайцевим (1991) розроблений метод математичної обробки гістерограм, заснований на багатопараметричному аналізі процесу скорочування-розслаблення з урахуванням фазності м'язових скорочень і хронотропних змін, що спостерігаються при скороченні м'язів у тварин і людини. Показано, що поодинокі скорочення матки при дії на міометрій різноманітних фармакологічних речовин суттєво відрізняються за «часовими» і «енергетичними» параметрами.

Для інформативної характеристики гістерограм достатньо виміряти 4 параметри (табл. 1):

- час фази скорочення ( $t_1$ );
- час фази розслаблення ( $t_2$ );
- інтервал між скороченнями ( $t_3$ );
- максимальну амплітуду (ВД).

В окремих випадках необхідно визначити величину тонуусу матки та деякі інші показники:

- тривалість скорочення ( $\lambda$ );
- тривалість маткового циклу ( $I$ );
- частоту скорочень ( $r$ ) за 10 хв;
- коефіцієнт асиметрії ( $\tau$ );
- індекс ритму ( $i$ );
- роботу, що виконує міометрій в процесі скорочення – розслаблення ( $A$ ), а також окремо для фази скорочення і розслаблення матки;
- швидкості ( $V_1, V_2$ );
- площі, відповідні окремим фазам ( $S_1, S_2$ );
- імпульси сил ( $I_1, I_2$ );
- середні сили ( $F_1, F_2$ ) і потужності ( $P_1, P_2$ ).

Імпульс сили фаз скорочення і розслаблення знаходять шляхом множення  $S_1$  і  $S_2$  на коефіцієнт розмірності  $H$ , який вираховується при калібруванні відповідного перетворювача:

$$H = F(t)/S,$$

де  $F$  – сила калібрувального сигналу,  $t$  – час дії цієї сили,  $S$  – площа калібрувального сигналу.

Показником для оцінки СДМ, у якому відображені вертикальні і горизонтальні параметри, є інтегральна інтенсивність маткових циклів ( $\Pi$ ).

#### 4. Визначення залежності «доза-ефект» при дослідженні утеротонічних засобів

Для кількісної оцінки стимулюючого впливу БАР на скорочувальну функцію матки визначають  $EC_{50}$  загальноприйнятими методами. За балограмами «від'ємний логарифм концентрації-ефект» визначають величину константи дисоціації ( $K_{дис}$ ) комплексу агоніст-рецептор, чисельно рівний молярній концентрації препарату, що викликає 50% ефект від максимального. Як тест-препарат використовується найближчий за фармакологічними властивостями до досліджуваного (окситоцин, пітуїтрин, простагландини, бета-блокатори тощо). У разі необхідності за величиною  $K_{дис}$  обчислюють константу спорідненості ( $K_c$ ), яка є величиною зворотною до  $K_{дис}$ .

## 5. Визначення залежності «доза-ефект» при дослідженні утеролітичних засобів

Міометрій до взаємодії з БАР має певну інтенсивність скорочування. Тому для оцінки залежності «доза-ефект» доцільно використовувати не середньо-ефективні величини  $CE_{50}$  і  $DE_{50}$ , визначені за [15], а значення  $II_{50}$ .

Для антагоністів скорочувальної активності матки  $СII_{50}$  – це концентрація, що призводить до зниження вихідного  $II$  на 50%. За умов цілісного організму встановлюють відповідно  $ДII_{50}$  – дозу, що знижує вихідний  $II$  на 50%. Для визначення даних величин вивчають не менше 3 доз речовини, що досліджується. При цьому для визначення  $CI_{50}$  і  $ДII_{50}$  можна використовувати як логарифмічну шкалу, так і натуральні величини доз, що спрощує даний метод визначення.

## 6. Скринінг БАР на утеролітичну та утеротонічну активності

Досліди проводять на ізольованих відрізках рогів матки невагітних або вагітних білих щурів за методикою, описаною вище. Після запису фонові кривої до встановлення однотипних скорочень матки речовину вводять безпосередньо у двостінну склянку, починаючи з концентрації  $10^{-4}$  М, а далі зменшують її залежно від прояву ефекту. При цьому необхідно враховувати латентний період від моменту початку дії речовини до здійснення фармакологічної реакції. У більшості випадків відзначається така залежність: чим коротший цей час, тим більш активною є сполука, що досліджується. Так, відомі токолітики (партусистен, ритодрин і ін.) практично миттєво здійснюють розслаблюючий вплив на міометрій.

Якщо розслаблююча дія БАР проявляється у концентрації меншій  $10^{-5}$  М, слід вивчити її поглиблено. У разі, якщо при виявленні потенційного антагоніста амплітуда скорочення міометрія суттєво не зменшується, можна проводити експерименти з відомими антагоністами для виявлення потенціюючих властивостей речовини [1] або проаналізувати їх дію на «часові» показники гістерограм за схемою, поданою у таблиці 2.

Таблиця 2

*Схема прогнозу виявлення утеролітичних властивостей БАР в залежності від їхнього впливу на часові параметри гістерограм*

№	Основні показники гістерограм	Результат прогнозу
1	$X'_{max} = X_{max} \cdot t'_1 = t_1 \cdot t'_2 = t_2 \cdot t'_3 = t_3$	Індиферентна речовина
2	$X'_{max} = X_{max} \cdot t'_1 > t_1 \cdot t'_2 = t_2 \cdot t'_3 = t_3$	Антагоніст
3	$X'_{max} = X_{max} \cdot t'_1 = t_1 \cdot t'_2 < t_2 \cdot t'_3 = t_3$	Антагоніст
4	$X'_{max} = X_{max} \cdot t'_1 = t_1 \cdot t'_2 = t_2 \cdot t'_3 > t_3$	Антагоніст
5	$X'_{max} < X_{max} \cdot t'_1 = t_1 \cdot t'_2 = t_2 \cdot t'_3 = t_3$	Антагоніст

Індекс « ' » – значення показника після дії речовини, що досліджується.

Процес прогнозування спрощується при використанні параметру  $II$ . Якщо ступінь  $II$  при дії БАР зменшується більше, ніж на 20%, то таку сполуку можна віднести до потенційних утеролітиків.

## 7. Поглиблене вивчення утеролітичної та утеротонічної активності БАР

Для БАР, які проявили в скринінгових дослідах активність у концентрації меншій ніж  $10^{-5}$  М, проводиться поглиблене вивчення впливу їх на скорочувальну активність матки за такою схемою.

### У досліджах *in vitro*

1. Перспективну речовину вивчають на невагітних щурах, що народжували, або вагітних не менше, ніж у 3 концентраціях, і визначають  $CE_{50}$  або  $CI_{50}$ . Утеролітичну та утеротонічну активності БАР порівнюють з еталонним препаратом. Як препарат порівняння використовують найбільш ефективні за токолітичною або утеротонічною дією ліки, бажано з тієї фармакологічної групи, до якої належить речовина, що досліджується. Наприклад, препаратом порівняння з групи М-холінолітиків може бути метацин, інгібіторів кальцієвих каналів – піфедипін (коринфар) чи ізоптин,  $\beta_2$ -адреноміметичних засобів – партусистен, орципреналіну сульфат, ритодрин та інші.

На основі експериментальних даних можна обчислити так званий індекс чутливості (ІЧ) речовини та еталонного препарату, який допомагає судити про чутливість до них невагітної і вагітної матки.

$$ІЧ = \frac{CE_{50} \text{ невагітних}}{CI_{50}} \Bigg/ \frac{CE_{50}}{CI_{50}} \text{ вагітних}$$

2. Пригнічуючу дію препарату на скорочувальну функцію матки вивчають на різноманітних видах тварин (мурчаках, кролицях) з визначенням  $CE_{50}$ ,  $CI_{50}$ ,  $K_{лиц}$ ,  $K_c$ .

3. Вплив речовини на скорочувальну активність матки визначають на 9-й день і встановлюють  $CE_{50}$  і  $CI_{50}$ .

### У досліджах *in situ*

Дані про специфічність дії перспективної речовини, отримані на ізольованому міометрії, підтверджують у досліджах в умовах цілісного організму тварин. Дослідження можна проводити на одному виді тварин (вагітних і невагітних, на ранніх і пізніх строках вагітності). Для цього бажано вибрати тварин, міометрій яких у досліджах *in vitro* виявився найбільш чутливим до дії цієї речовини.

Речовину вводять у зростаючих дозах до досягнення максимального ефекту. Шлях введення повинен відповідати тому, який буде використовуватись при клінічному застосуванні. Встановлюють час початку виявлення утеротонічного або токолітичного ефекту; час, коли настане повне скорочення або розслаблення гладеньких м'язів матки; величину зміни тонусу міометрія; початок відновлення 50% амплітуди порівняно з початковою; частоту скорочень 50% амплітуди порівняно з фоном.

Для більш повної характеристики перспективної речовини можна використовувати розроблений індекс чутливості динамічних скорочень (ЧДС) і індекс чутливості тонічної напруги (ЧТН) залежно від прояви фармакологічного ефекту. Перший визначається, якщо при введенні речовини настає зменшення тільки амплітуди скорочень, другий – коли знижується тонус матки. Для їх розрахунку необхідні показники середньоєфективних доз, що призводять до зниження амплітуди або тонусу міометрія.

$$ЧДС = \frac{DE_{50} \text{ (за ампл.) невагітних}}{DE_{50} \text{ (за ампл.) вагітних}}$$

$$ЧТН = \frac{DE_{50} \text{ (за тонусом) невагітних}}{DE_{50} \text{ (за тонусом) вагітних}}$$

Результати дослідів порівнюють з аналогічними даними, отриманими для препарату порівняння.

При експериментальному вивченні утеротонічних і утеролітичних речовин потрібно також давати загальну фармакологічну характеристику, яка супроводжує їх специфічну дію. Специфічний ефект токолітиків може доповнюватись вивченням їх впливу на судини внутрішніх



органів і периферичні судини, стан системи згортання крові, стан вегетативної нервової системи.

## **8. Вивчення впливу перспективних препаратів на функціональний стан материнського організму і плодів**

Проблема фармакотерапії вагітних робить актуальним пошук не тільки ефективних, але і безпечних для матері та плода токолітиків. Тому для найбільш активних речовин, що виявили *in vitro* та *in situ* утеродепримуєчу дію на рівні препарату порівняння або вище, необхідно вивчати вплив БАР на функціональний стан материнського організму і плодів.

Досліди проводять на вагітних щурах. У кожную дослідну групу входить по 6–7 тварин. Речовину, що вивчається, та препарат порівняння вводять у плідний період з 16-го по 20-й день вагітності кожного дня в дозі, що чинить 50% утеролітичний ефект. Щурам контрольної групи вводять фізіологічний розчин.

На 21-й день вагітності щурів наркотизують (3 мл 2,5% розчином тіопенталу натрія внутрішньоочеревинно). Проводять операцію накладання електродів відведення на один з плодів для реєстрації ЕКГ. У щурів, крім ЕКГ, записують дихання. Реєстрацію цих показників здійснюють на поліграфі. Враховують частоту серцевих скорочень у матері та плода (удар/хв.), частоту дихання у щура за хвилину. Фармакологічний ефект речовини оцінюють за зміною показників ЕКГ і дихання після його введення порівняно з фоном. Отримані результати порівнюють з показниками у контрольній групі і з даними препарату порівняння.

## **9. Вивчення впливу перспективних сполук на ріст та розвиток плода**

Дослідження впливу найбільш активних сполук на ріст і розвиток плода проводять відповідно до вимог методичних рекомендацій [7, 8].

На 21-й день вагітності після евтаназії тварин вивчають ембріональний матеріал. Визначають число жовтих тіл, число живих і мертвих плодів, загибель плодів до і після імплантації, загальну ембріональну смертність, масу і розмір плодів, плаценти, плацентарний коефіцієнт. Частину плодів фіксують у рідині Бусна і на мікрозрізах за методом Вільсона у модифікації А.П.Дибана і співавт. (1970), а потім під бінокулярним мікроскопом визначають можливі аномалії розвитку внутрішніх органів. Іншу частину плодів фіксують в 96% етанолі, забарвлюють алізарином червоним і досліджують стан кісткової системи плодів за методом Доусона. Результати дослідження ембріонального матеріалу обробляють статистично з використанням критерію Стюдента. Дані про вплив речовини на внутрішні органи і кісткову систему плодів виражають у відсотках до загального числа плодів.

Вивчення загальної та хронічної токсичності перспективних утеротоніків і утеролітиків проводять стандартними методами, що використовуються при дослідженні нешкідливості фармакологічних речовин.

Етапи доклінічного вивчення БАР з утеролітичною активністю відображені на схемі.

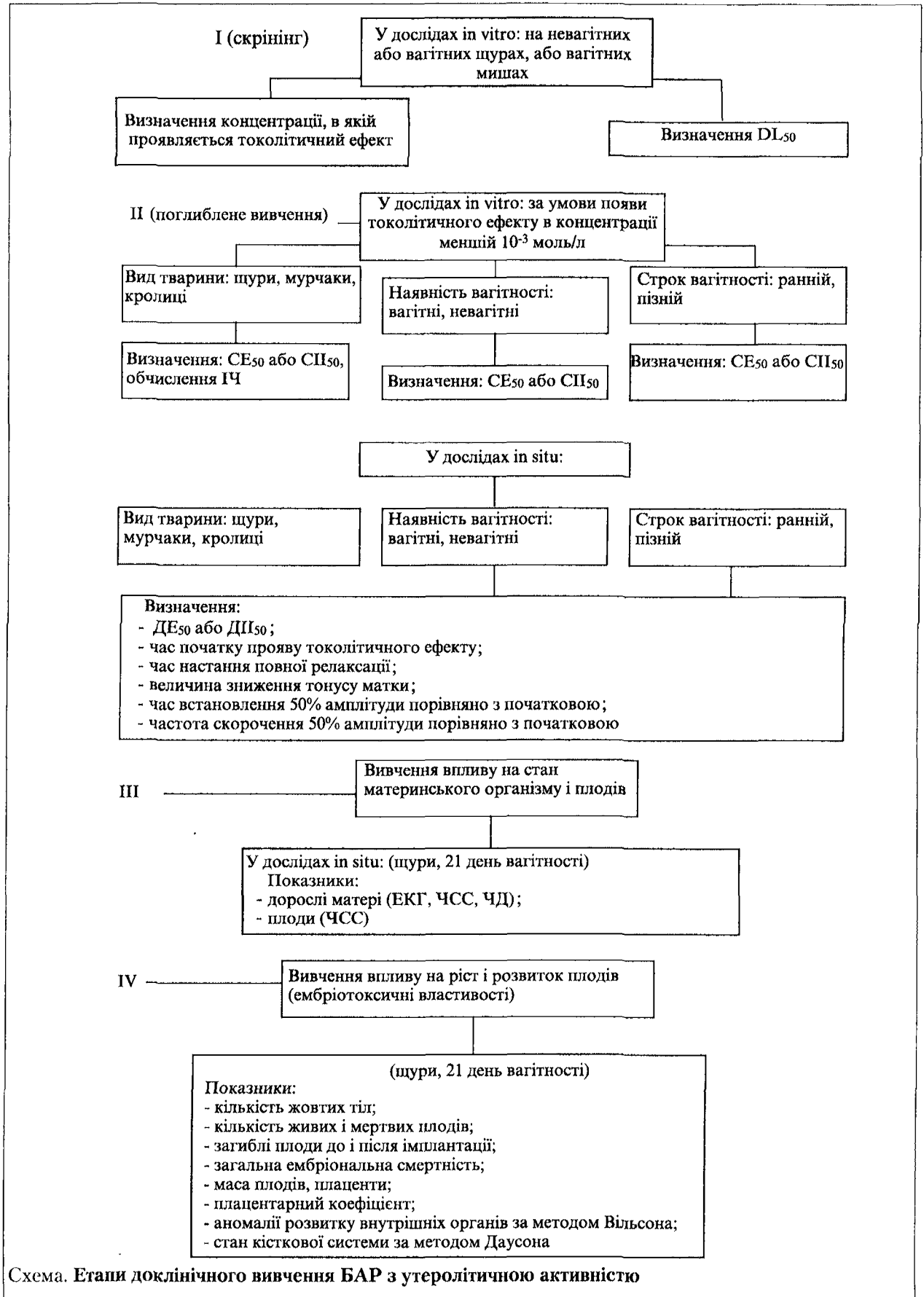


Схема. Етапи доклінічного вивчення БАР з утеролітичною активністю

## Література

1. Блаттнер Р., Классен Х., Денерт Х. Эксперименты на изолированных препаратах гладких мышц.– М.: Мир, 1983.– 194 с.
2. Дуда И.В. Нарушения сократительной деятельности матки.– Минск: Беларусь, 1989.– 222 с.
3. Зайцев Л.М. Фармакологическая регуляция сократительной функции матки: Автореф. дисс.... д-ра мед. наук.– К., 1991.– 25 с.
4. Котурбац Т.В. Изменение быстрых биопотенциалов мышц матки крольчих в условиях хронической гипоксии//Бюлл. эксперим. биол. и мед.– 1978.– Т.85, №6.– С. 667–670.
5. Лановой И.Д. Электрофизиологический анализ изменения состояния мышц матки под влиянием некоторых фармакологических препаратов, применяющихся в акушерско-гинекологической клинике: Автореф. дисс.... д-ра мед. наук.– К., 1969.– 27 с.
6. Лисовская Г.М. Вопросы теории и практики электрогистерографических исследований: Автореф. дисс.... д-ра мед. наук.– Свердловск, 1963.– 35 с.
7. Методические указания по изучению эмбриотоксического действия фармакологических веществ и их влияния на репродуктивную функцию.– М.: ФК МЗ СССР, 1986.– 24 с.
8. Методические рекомендации по представлению документации на лекарственные средства в Фармакологический комитет Министерства здравоохранения Украины.– К.: ФК МЗ Украины, 1993.– 36 с.
9. Несонова И.Ф. К вопросу определения коэффициента асимметрии волны сокращения при основных видах родовой деятельности //Матер. XI научн. конф. молодых специалистов.– Л., 1971.– С. 214–216.
10. Персианинов Л.С., Железнов Б.И., Богоявленская Н.В. Физиология и патология сократительной деятельности матки.– М.: Медицина, 1975.– 360 с.
11. Предтеченский Б.Е. Руководство по клиническим лабораторным исследованиям.– М.: Медгиз, 1960.– 355 с.
12. Пронина Г.М., Изаков В.Я. К проблеме оценки сократимости миометрия//Акуш. и гинекол.– 1982.– №9.– С. 47–50.
13. Рыженко И.М. Скрининговые исследования производных фенилалкиламинов на миометрий крыс и мышей//Провизор.– 1999.– №6. - С. 65.
14. Сизов П.И. Фармакодинамическая характеристика утеротропной активности производных гамма-аминомасляной кислоты и бензодиазепина: Автореф. дисс.... д-ра мед. наук. - Купавна, 1992.– 37 с.
15. Хаджай Я.И. О графическом способе определения эффективной дозы и ее доверительных границ при учете реакции в градированной форме//Фарм.кол. и токсикол. 1965. №1. - С. 118–122.
16. Хасин А.З. Метод математического анализа гистерограммы//Акуш. и гинекол.– 1971.– №12.– С. 31- 35.
17. Хилл А.В. Механика мышечного сокращения. Старые и новые опыты.– М.: Мир, 1972.– 364 с.
18. Шминке Г.А. К вопросу оценки гистерограмм//Акуш. и гинекол.– 1980.– №7.– С. 42 43.
19. Smith R. A. Brief history of intrauterine pressure measurement//Acta Obstet. Gynecol. Scand. (Suppl.).– 1984.– №129.– P. 1–24.

## ДОКЛІНІЧНЕ ВИВЧЕННЯ ГЕРІАТРИЧНИХ ПРЕПАРАТІВ

Фролькіс В.В.,

Купраш Л.П.,

Безверха І.С.,

Заїка М.У.,

Пантелеймонова Т.М.,

Шарабура Л.Б.

### Перелік скорочень

**в/в** – внутрішньовенно

**в/о** – внутрішньоочеревинно

**ЗХС** – зв'язаний холестерин

**ЛВЩ** – ліпопротеїни високої щільності

**ЛДНЩ** – ліпопротеїни дуже низької щільності

**ЛНЩ** – ліпопротеїни низької щільності

**ЛП** – ліпопротеїни

**МДА** – малоновий діальдегід

**ПАГ** – поліакриламідний гель

**ПОЛ** – перекисне окислення ліпідів

**СОД** – супероксиддисмутаза

**ТБК** – тіобарбітурова кислота

**ТГ** – тригліцериди

**УФ** – ультрафіолетовий

**ХС** – холестерин

### 1. Загальні вимоги до геропротекторних препаратів та методи їх вивчення

Геріатричні препарати є засобами фармакологічного впливу на структуру, функції та процеси обміну старіючого організму, дія яких спрямована на запобігання передчасному старінню та збільшення тривалості життя.

Згідно з адаптаційно-регуляторною теорією старіння, запропонованою академіком НАН і АМН України В.В.Фролькісом, у ході еволюції поряд зі старінням виник процес антистаріння або вітаукт, який підтримує адаптаційні можливості організму, його життєздатність. Тривалість життя визначається взаємодією цих двох процесів, а їх дисбаланс може призвести до прискореного старіння організму, яке відрізняється від фізіологічного (нормального) старіння більш швидким темпом розвитку вікових змін органів і систем організму в цілому [1].

До факторів, що сприяють прискореному старінню, слід віднести порушення генетичної програми розвитку, вікові зміни метаболічних процесів і функцій, нейрогуморальної регуляції, які обмежують адаптаційні можливості організму і спричиняють розвиток вікової патології (атеросклероз, цукровий діабет, злоякісні новоутворення, остеопороз, паркінсонізм, хвороба Альцгеймера). Не останню роль відіграють і впливи зовнішнього середовища (соціальні,

біологічні, екологічні), які ініціюють патологічні функціональні, метаболічні і морфологічні порушення в організмі, призводять до розвитку передчасного старіння.

Демографічна ситуація, що склалася в країні в останні роки, характеризується «постарінням» населення не лише за рахунок збільшення кількості людей віком понад 60 років, але й у результаті росту передчасного, прискореного старіння [2].

Пошук фармакологічних засобів профілактики прискореного старіння і збільшення тривалості життя, так званих геріатричних засобів, повинен здійснюватись по шляху створення лікарських препаратів, що сповільнюють темп старіння, активізують процеси антистаріння.

Виходячи з сучасних уявлень про старіння як багатопрічинний і багатоосередковий процес, а також беручи до уваги роль вікової патології і середовищних факторів у механізмах прискореного старіння, більшість дослідників вважають, що сучасні геріатричні засоби повинні відповідати таким вимогам:

1) здійснювати нормалізуючий вплив на лімітуючі ланки процесу старіння – генетичний апарат клітин, стан клітинних біомембран, вільнорадикальні процеси (перекисне окислення ліпідів), енергетичне забезпечення клітини, систему мікросомального (монооксигеназного) окислення, нейроендокринну регуляцію;

2) виявляти терапевтичний ефект при лікуванні захворювань у людей похилого і старечого віку;

3) зменшувати негативні ефекти від впливу на організм середовищних факторів (хімічних, променевих, стресорних);

4) не мати побічного токсичного впливу на старечий організм.

Отже, до геріатричних засобів можуть бути віднесені різноманітні лікарські препарати, неоднорідні за хімічною структурою та механізмом дії. Ці обставини, а також відсутність адекватних моделей і загальноприйнятних чітких критеріїв старіння значно ускладнює трактовку результатів експериментальних досліджень з питань оцінки фармакологічної активності потенційних геріатричних засобів, що вивчаються.

Тому запропоновані рекомендації мають на меті уніфікувати методичні підходи до вибору матеріалів і методів, які застосовуються при доклінічному вивченні нових лікарських препаратів – потенційних геріатричних засобів (види лабораторних тварин, їх вік, основні тести для оцінки специфічної фармакологічної активності, вікові особливості фармакокінетики, тощо). Наведена програма вивчення включає широкий комплекс досліджень, з числа яких цілеспрямовано вибираються ті, що дозволяють об'єктивно оцінити ефективність досліджуваного препарату як геріатричного засобу.

Інформація, отримана в умовах експерименту, є основою для визначення оптимальних доз, способів застосування і визначення тривалості курсу лікування при апробації препарату в геріатричній клініці.

## 2. Відбір тварин для досліджень

Основними вимогами, які необхідно враховувати при доклінічному вивченні нових геріатричних засобів, є лінія і вік лабораторних тварин. Існує понад 20 ліній щурів і більше 50 ліній лабораторних мишей, вибір яких визначається конкретною метою дослідження. У довготривалих дослідженнях при доклінічному вивченні потенційних геропротекторних засобів можуть бути використані традиційні (конвенціональні), обов'язково паспортизовані лабораторні гризуни – безпородні білі миші та щури, кролі породи Шиншила. Для вивчення механізмів старіння, характеру впливу на організм зовнішніх факторів, в тому числі фармакологічних, використовуються відповідні лінії тварин, що є природною моделлю певних патологічних станів – миші ліній CBA, AKR, BALB/c, C57BL/6, щури ліній SD, Wistar та ін.

Дослідження повинні проводитись на старих тваринах, тоді як дорослі й молоді тварини використовуються як контроль.

## Оцінка специфічної фармакологічної активності лікарських засобів

При проведенні експериментів з вивчення дії лікарських засобів на тваринах різного віку може бути рекомендована класифікація вікових періодів лабораторних тварин, прийнята Інститутом геронтології АМН України, яка наведена в таблиці.

Класифікація складена на підставі багаторічного вивчення вагових, лінійних, функціональних, метаболічних показників у паспортизованих лабораторних тварин різних вікових груп і аналізу даних літератури [3]. В основу періодизації покладені анатомо-фізіологічні особливості тварин, інтенсивність їх росту, поведінка, зміни в статевій сфері. За відсутності специфічних показників старіння, розмежування віку у тварин є дещо умовним, проте наведена класифікація може бути використана як при вивченні потенційних геропротекторних засобів, так і питань геріатричної фармакології взагалі [3].

Таблиця

**Вагові та лінійні показники лабораторних тварин різних вікових груп**

Показник	Періоди онтогенезу				
	репродуктивний		виразних старечих змін		
	молоді	дорослі	передстарі	старі	дуже старі
<b>Собаки (західноєвропейська вівчарка)</b>					
Вік	9-24 міс	3-4 роки	5-6 років	7-12 років	13-20 років
Маса, кг	19-28	28-32	32-34	34-40	30-40
<b>Кішки</b>					
Вік	7-18 міс	19-36 міс	4-5 років	6-9 років	10-15 років
Маса, кг	1,8-2,5	2,5-3,0	3,0-3,2	3,3-3,6	3,5-4,5
<b>Кролі</b>					
Вік	7-8 міс	19-20 міс	31-42 міс	3,5-6 років	7-12 років
Маса, кг	2,5-4,0	4-5	5,0-6,5	5,5-6,0	4-6
Обхват грудної клітки, см	30-36	34-38	36-40	38-42	40-44
Довжина тіла, см	40-41	42-46	44-48	46-50	46-52
<b>Мурчаки</b>					
Вік	6-18 міс	19-30 міс	31-42 міс	3,5-5 років	6-8 років
Маса, кг	0,65-0,80	0,70-0,85	0,75-0,88	0,8-0,9	0,8-0,9
Обхват грудної клітки, см	19-21	20-22	20-23	20-24	20-24
Довжина тіла, см	28-29	29-31	30-32	32-33	32-34
<b>Щури білі</b>					
Вік, міс	5-10	11-18	19-23	24-30	31-40
Маса, кг	0,21-0,34	0,26-0,36	0,28-0,40	0,32-0,46	0,30-0,45
Обхват грудної клітки, см	11-13	12,0-13,5	12-14	13-15	13-15
Довжина тіла, см	15-22	21-23	21-24	22-25	22-25
Довжина хвоста, см	16-18	18-19	18-19	18,0-19,5	18,0-19,5
<b>Миші білі</b>					
Вік, міс	3-6	7-10	11-15	16-20	21-30
Маса, г	22-28	27-32	31-36	35-42	35-46
Довжина тіла, см	8,0-9,2	8,5-9,5	9-9,6	9,5-9,7	9,5-9,8
Довжина хвоста, см	6,5-8,0	8-9	9-9,5	9,0-9,5	9,2-9,5
<b>Хом'яки золотисті</b>					
Вік	3-6 міс	9-12 міс	13-18 міс	19-36 міс	4-5 років
Маса, г	120-140	120-150	140-160	150-165	150-170

### 3. Методи оцінки специфічної фармакологічної активності речовин, що вивчаються як геропротекторні засоби

Підходи до вивчення нових геріатричних засобів базуються на сучасних уявленнях про механізми старіння. Оскільки відсутні специфічні показники, що відображають ступінь і характер процесу старіння, то при вивченні специфічної фармакологічної активності нових геріатричних препаратів слід вивчати їх вплив як на внутрішні фактори, що обумовлюють процеси старіння (генетичний апарат клітин, стан клітинних мембран, інтенсивність вільнорадикальних процесів, енергетичну забезпеченість клітин, систему мітосомального окислення, нейрогуморальну регуляцію), так і на функціональні, метаболічні і морфологічні порушення, що виникають під впливом зовнішніх факторів (хімічних, фізичних, біологічних), які сприяють розвитку прискореного старіння.

З існуючих численних тестів, які застосовуються при доклінічному вивченні лікарських засобів взагалі, слід вибрати більш доступні, адекватні методики, такі, що відтворюються в умовах експерименту і можуть бути рекомендовані для досліджень при відборі і фармакологічному вивченні саме потенційних геропротекторних засобів.

#### *3.1. Вивчення впливу на тривалість життя експериментальних тварин*

Інтегральним показником, що характеризує ефективність геропротекторних засобів, є їх вплив на тривалість життя. Ефективність такого дослідження залежить від адекватності вибору біологічної моделі. Для скринінгу нових геропротекторів поряд з гризунами (миші, щури, мурчаки, хом'ячки) можуть використовуватись дрозофіли, культура клітин тощо.

Вимоги до біологічного об'єкту, який використовується в дослідженнях по пролонгуванню життя, ідентичні до загальних вимог щодо тварин при вивченні старіння. Важливою додатковою вимогою є повноцінність лінії тварин за показником тривалості життя. Якщо ця вимога не виконується, то зростання тривалості життя може бути інтерпретоване не як ознака геропротекторної дії досліджуваного засобу, а як свідчення про усунення дефектів геному або різних умов утримання тварин. Для таких досліджень краще використовувати мишей лінії C57BL/6 і щурів ліній SD і Wistar. Разом з тим, дослідження по пролонгуванню життя проводять і на безперодних наспортизованих тваринах.

При вивченні впливу фармакологічних засобів на тривалість життя перевага надається тим тваринам, вік яких на початок досліду становить 5–6 місяців для мишей і 10–12 місяців для щурів. Досліджуваній засіб призначають курсами тривалістю 3–4 тижні, з перервою між курсами 3–4 місяці, до природної загибелі тварин. Протягом всього періоду дослідження за тваринами ведеться спостереження. Проводиться щоденний клінічний огляд, враховуються рухова активність, стан шерсті, еластичність шкіри, колір зубів, поїдання корму за добу, динаміка маси тіла. Загиблих тварин піддають секції, дату та причину загибелі реєструють у протоколі виживання дослідних тварин.

Показниками тривалості життя є виживання, смертність, середня і максимальна тривалість життя. За кількістю днів, прожитих кожною твариною, складаються таблиці й криві виживання. До таблиць вносять цифри, що характеризують відношення кількості тварин, що вижили (%) за певний інтервал часу, до загального числа тварин, взятих у дослід. Ці ж дані можуть бути викладені у вигляді кривих виживання, які демонструють зміну кількості тварин у часі. Для побудови кривих застосовують два прийоми: 1 – точки на кривій виживання наносять по мірі того, як кожна загибель тварини змінює число тих, що вижили; 2 – використовують дані про виживання, віднесені до певного інтервалу часу, наприклад, до 100-добового періоду.

Таблиці смертності складаються за аналогією з демографічними таблицями смертності для людської популяції.

Середня тривалість життя (середній вік на момент смерті) експериментальних тварин розраховується як середнє арифметичне варіаційного ряду, який складається з індивідуальних тривалостей життя. Розрізняють абсолютну і умовну середню тривалість життя. Абсолютну можна розрахувати тоді, коли спостереження і облік особин, що вижили, ведеться з моменту народження і до природної загибелі. Для оцінки впливу різних факторів, в тому числі фармакологічних, на процеси старіння можна розпочинати спостереження за смертністю з більш старшого віку і розраховувати так звану умовну тривалість життя. Середня тривалість життя, розрахована після смерті останньої тварини як середнє арифметичне тривалостей життя всіх особин даної групи піддослідних тварин, називається середньою тривалістю життя при 100% смертності. Крім цього показника, розраховують також середню тривалість життя при 20 і 50% смертності.

Максимальною тривалістю життя вважають тривалість життя останньої особини. Щоб зменшити вплив випадковостей, за максимальну тривалість життя слід приймати середню тривалість життя останніх 10 особин. Цей показник дозволяє статистично підійти до оцінки максимальної тривалості життя при дії на організм досліджуваних препаратів [4, 5].

### ***3.2. Вивчення ефективності потенційних геріатричних засобів у спонтанно старіючих тварин***

Дослідження проводяться на тваринах двох вікових груп – старих і молодих. Вік тварин різних видів визначається відповідно до таблиці.

Оцінку отриманих результатів проводять, порівнюючи вікові відмінності вихідних величин показників і їх динаміку на тлі проведеної терапії. Беручи до уваги ті обставини, що у старих тварин в умовах функціональних навантажень знижуються компенсаторно-адаптаційні можливості організму, для оцінки ефективності досліджуваних засобів слід застосовувати адекватні навантажувальні проби. Вивчення ефективності препаратів, призначених для лікування вікової патології, необхідно проводити на експериментальних моделях відповідних патологічних процесів у старих тварин.

#### ***3.2.1. Вивчення впливу на ліпідний обмін***

На сьогодні накопичено переконливі дані про те, що атеросклероз є найбільш поширеною патологією серцево-судинної системи, пов'язаною з віком, і відіграє провідну роль у розвитку прискороеного старіння. В Україні серцево-судинна патологія, як наслідок атеросклерозу, є причиною смерті у 58% випадків (у структурі загальної смертності) і причиною інвалідизації – в 33% випадків, що зумовлює стійкий негативний вплив на середню тривалість життя. Серед факторів ризику в формуванні атеросклерозу найбільш важливим є зростання з віком частоти дисліпопротеїнемій. Загальні закономірності вікових змін показників ліпідного обміну полягають у зростанні розмірів жирового депо, ліпоїдозі внутрішніх органів, підвищенні в крові та тканинах вмісту як загальних, так і окремих фракцій ліпідів, і особливо атерогенних ліпопротеїнів. Збільшення з віком вмісту холестерину пов'язане з порушеннями в усіх ланках системи його метаболізму – синтезі, розпаді, всмоктуванні і екскреції. Зростання вмісту тригліцеридів зумовлене зниженням активності ліпопротеїнази. Причому, якщо по відношенню до окремих ліпідних показників вікові дані не однозначні, то зниження ліпопротеїназної активності при старінні відмічається у стінці аорти, міокарді, жировій епідидимальній тканині, селезінці, легенях тощо. З віком зростає вміст ліпопротеїнів низької і дуже низької щільності та знижується кількість ліпопротеїнів високої щільності. Вікові дисліпопротеїнемії та дисаполіпопротеїнемії лежать в основі розвитку атеросклерозу, оскільки переконливо доведено, що ЛП дуже низької, проміжної та низької щільності, які містять значну кількість ТГ і ХС, зумовлюють атерогенну дію, а ЛВЩ, що містять до 50% білка (апо А), мають антиатеросклеротичні властивості.



Беручи до уваги те, що атеросклероз є однією з найбільш поширених вікових патологій, необхідно вивчати вплив потенційних геропротекторних засобів на показники ліпідного обміну в експериментах як на спонтанно старіючих тваринах, так і за умов експериментальної гіперліпідемії у старих тварин, незважаючи на те, що на сьогодні все ще немає переконливих підстав вважати показники ліпідного обміну тими критеріями, зміна яких корелює з віковою тривалістю життя. При цьому застосовуються ті ж методи, що й при вивченні засобів гіполіпідемічної та протиатеросклеротичної дії [6].

Вивчення впливу потенційних геропротекторних засобів на ліпідний обмін проводять на старих щурах, кролях чи мурчаках. Для встановлення факту гіполіпідемічної дії моделюють гіперліпідемію одним з поширених методів.

1. Якщо робота виконується на щурах, то застосовують досить простий метод одержання індукованої гіперліпідемії введенням детергенту, наприклад тритону WR 1339 в дозі 225–250 мг/кг одноразово в/о [7]. Через 8–10 год після введення тритону спостерігається зростання в 6–8 разів рівня ТГ і в 3–4 рази – загального ХС. Досліджувану речовину вводять одночасно з детергентом, чи попередньо протягом кількох днів (звичайно 3–5). Показники ліпідного обміну ЗХС і ТГ визначають одним з поширених методів у сироватці крові, взятої у голодуючих 8–10 год (час дії тритону) тварин [8]. Як контроль використовують інтактних щурів того ж віку та щурів з гіперліпідемією, які одержували відповідний розчинник (вода, фізіологічний розчин, 2% крохмальний гель чи ін.)

2. Широко застосовують метод одержання гіперліпідемії у щурів за допомогою дієти, що включає холестерин (3–5%), тіоурацил (0,3%), холеву кислоту (1,0%). Додатково до дієти включають вітамін D<sub>2</sub> (3–30 тис. од). Тварини утримуються на дієті 3–4 тижні. В крові голодуючих протягом 12–18 год тварин визначають спектр ліпопротеїнів сироватки крові, вміст ЗХС та ТГ [8, 9].

На щурах зручно визначати також активність ліпопротеїніпази, яка при старінні знижується практично в усіх тканинах. Для цього використовують старих щурів-самців, яким вводять спочатку досліджувану сполуку одноразово або повторно, а потім внутрішньовенно гепарин 50 од/кг. Визначають ліполітичну активність [10] у першій (до введення гепарину) та другій, взятій через 10 хв після введення гепарину, пробах крові.

3. При роботі з кролями експериментальну гіперхолестеринемію викликають тривалим (2–3 місяці) введенням у плунок ХС в дозі 0,2 мг/кг у вигляді суспензії на олії. Досліджувану речовину вводять одночасно з ХС. Після закінчення терміну введення з'ясовують характер впливу на вміст ЗХС,  $\alpha$ -ХС, ТГ у сироватці крові, а також вміст ХС в аорті та печінці. Ступінь ліпідозу аорти можна встановити також гістоморфологічними методами. При можливості визначають спектр ліпопротеїнів сироватки крові методом електрофорезу в поліакриламідному гелі.

Дуже важливо визначати вміст аполіпопротеїнів апо А і апо В, використовуючи один з багатьох існуючих методів: радіальної імунодифузії, радіоімунологічного, імунонефелометричного, електроімунологічного чи імуноферментного аналізу.

Емпірично за формулою Фрідвальда можна розрахувати кількість холестерину ЛНЩ ( $\beta$ -ХС) як:  $\text{ЗХС} - (\alpha\text{-ХС} + 1/5 \text{ТГ})$ , а також коефіцієнт атерогенності:  $K = (\text{ЗХС} - \alpha\text{-ХС})/\alpha\text{-ХС}$ .

Як і в попередньому дослідженні, контролем є інтактні тварини відповідного віку та тварини з гіперліпідемією, які не отримували досліджувану речовину.

Слід враховувати індивідуальну чутливість кролів та значні коливання отриманих даних, що зумовлює необхідність включати в групи не менше 10 тварин. Якщо виявляються стійкі до патології тварини, вони вибраковуються.

4. Гіперліпідемію у старих мурчаків (самців) викликають також за допомогою дієти, яка містить 1,6% ХС та 15% рослинної олії [11]. Через 6–10 діб після її призначення у тварин спостерігається гіперліпідемія, яка посилюється при більш тривалому призначенні дієти. Характер впливу досліджуваної сполуки на ліпідний обмін оцінюють за показниками ЗХС і ТГ в сироватці крові і печінці.

### 3.2.2. Вивчення впливу на процеси перекисного окислення ліпідів (ПОЛ)

На сьогодні вважається доведеним, що з віком виснажується система антиоксидантного захисту, звужуються межі її фізіологічної норми. Допускається існування корелятивної залежності між видовою тривалістю життя та показниками системи антиоксидантного захисту, зокрема, з активністю окремих ізоформ супероксиддисмутази (СОД) та вмістом  $\alpha$ -токоферолу, а також негативної кореляції між видовою тривалістю життя та аутоокислювальними процесами. Встановлено, що збільшення продукування активних форм кисню є провідним механізмом деструкції клітинних мембран і загибелі клітин при різних патологіях, а також спільною ланкою найрізноманітніших захворювань та старіння [12].

Показниками посилення перекисного окислення є не тільки збільшення кількості продуктів ПОЛ, а й швидкість виснаження антиоксидантних ресурсів, здатних утримувати процес у фізіологічно безпечних межах. Тому при всебічній оцінці антиоксидантного статусу клітин (організму) та впливу на нього досліджуваної речовини необхідно враховувати, при можливості, всі компоненти окисного гомеостазу у їх взаємодії – стан прооксидантно-антиоксидантної рівноваги, спрямованість і ступінь її зміщення.

Внутрішньоклітинний контроль за вмістом вільних радикалів забезпечує ензимна система інактивації активних форм кисню (СОД, каталаза і пероксидаза) та природні антиоксиданти ( $\alpha$ -токоферол, аскорбінова кислота та деякі інші). Тому при доклінічному вивченні впливу геріатричних препаратів на процеси ПОЛ у біологічному субстраті спонтанно старіючих тварин (сироватці крові, гомогенатах тканин чи фракціях плазматичних, мікросомальних, мітохондріальних, лізосомальних мембран) визначають основні показники інтенсивності і динаміки ПОЛ – продукти переокислення, активність антиоксидантних ферментів та кількість антиоксидантів різних типів.

1. Первинні продукти ПОЛ – гідропероксиди і дієнові кон'югати – характеризуються інтенсивним поглинанням в УФ ділянці спектра (232 и 233 нм) і можуть ідентифікуватись звичайними спектрофотометричними методами [13].

2. Вторинні продукти ПОЛ – малоновий діальдегід (МДА) визначають за реакцією з тіобарбітуровою кислотою (ТБК-активні продукти) безпосередньо в біологічному субстраті [13] або в модельній системі за умов індукції ПОЛ в середовищі певного складу [14].

При вивченні спонтанного ПОЛ інкубаційне середовище містить 50 ммоль/л трис-НСl, 160 ммоль/л КСl (рН 7,4) і 0,1 мл сироватки або 50 мг гомогенізованої тканини чи іншого біологічного матеріалу.

При індукції неферментативного (аскорбатзалежного) ПОЛ в середовище інкубації вносять додатково 2,5 мкмоль/л  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  і 0,2 ммоль/л аскорбінової кислоти.

Індукцію ферментативного ПОЛ проводять в тому ж середовищі інкубації, додаючи до нього 1 ммоль/л НАДФН, 20 ммоль/л нікотинаміду, 4 ммоль/л АДФ, 2,5 ммоль/л  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ . Після інкубації при 37°C протягом 30–60 хв у пробах визначають кількість МДА. Можна розрахувати швидкість накопичення МДА (в ммоль на 1 г тканини за 1 хв).

Склад інкубаційного середовища в різних методиках може відрізнятись, однак слід враховувати, що аскорбінова кислота в концентрації до 0,2 ммоль/л стимулює НАДФН-залежне ПОЛ, а в концентрації більше 1,0 ммоль/л – пригнічує його. Крива залежності швидкості утворення МДА від концентрації аскорбінової кислоти перетинає вісь абсцис при концентрації біля 1 ммоль/л, тобто окислювач перетворюється в антиокислювач.

3. Активність СОД (пероксид:пероксид оксидоредуктаза – КФ 1.15.1.1.) визначають за реакцією відновлення нітротетразолію синього в присутності феназину метасульфату [15] або іншими прийнятими методами.

4. Активність каталази (пероксид водню: пероксид водню оксидоредуктаза – КФ 1.11.1.6.) – ферменту, що руйнує пероксиди та запобігає їх акумуляції, визначають в гемолізатах крові і розраховують за калібровочною кривою [15].

Кількісні зміни резерву антиоксидантної системи крові можна охарактеризувати за допомогою так званого фактора антиоксидантного стану:

$$\Phi = \frac{\text{активність каталази} \cdot \text{активність СОД}}{\text{концентрація МДА}} = \frac{(\text{МО/мг Нв})^2}{\text{нмоль/мл}}$$

Навіть в умовах успішної дезактивації супероксида СОД і пероксидів водню каталазою існує небезпека утворення особливо небезпечних радикалів  $\cdot\text{ОН}$ , час життя яких настільки малий, що їх ферментативна інактивація неможлива. Для цього необхідна інша система захисту, роль якої виконує система глутатіону. Як показники цієї системи визначають вміст глутатіону і активність ферментів його метаболізму (п.5–7).

5. Відновлений глутатіон – один з небілкових антиоксидантів [16].

6. Активність глутатіонпероксидази (глутатіон:пероксид водню оксидоредуктаза – КФ 1.11.1.9.) – за реакцією окислення відновленого глутатіону [17].

7. Активність глутатіонредуктази (НАДФН:окислений глутатіон оксидоредуктаза – КФ 1.6.4.2.) - за кількістю окисленого НАДФН [18].

Крім антиоксидантних ферментів, у антиоксидантному захисті беруть участь антиоксиданти, які мають антиперекисну та антирадикальну активність, знаходяться безпосередньо в мембранних структурах, тобто там, де є субстрати окислення, і виконують функцію мембраностабілізаторів. Із жиророзчинних антиоксидантів найважливішим є  $\alpha$ -токоферол.

8. Визначення  $\alpha$ -токоферолу в ліпідних фракціях, одержаних за Фолчем, проводять методом газорідинної хроматографії або спектрофотометричним методом [19].

### 3.2.3. Вивчення впливу на показники електролітного обміну

В процесі старіння порушується активність мембраноз'язаних ферментів плазматичних мембран клітин (транспортних АТФаз), одним з наслідків чого є внутрішньо/зовнішньоклітинний нерозподіл електrolітів у тканинах – зменшення внутрішньоклітинного вмісту калію і накопичення натрію в клітинах [20]. Нормалізація на тлі введення потенційного лікарського засобу показників електролітного обміну та активності транспортних АТФаз у мембранах тканин експериментальних тварин може свідчити про його геропротекторну дію.

Для оцінки активності  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -АТФази та  $\text{Mg}^{2+}$ -АТФази в плазматичних мембранах застосовують загальноприйняті методи виділення мембранних фракцій [13] та визначення активності ферментів. Загальну АТФазну активність визначають за накопиченням неорганічного фосфору в реакційній суміші, що містить 62 ммоль/л  $\text{NaCl}$ , 34 ммоль/л  $\text{KCl}$ , 5 ммоль/л  $\text{MgCl}_2$ , 25 ммоль/л трис- $\text{HCl}$ , 5 ммоль/л динатрієвої солі АТФ. Активність визначають у присутності  $1 \cdot 10^{-4}$  моль/л оубаїну. Активність  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -АТФази розраховують як різницю між загальною та  $\text{Mg}^{2+}$ -АТФазною активностями [21]. Стан очистки плазматичних мембран перевіряють за збагаченням фракції маркерним ферментом 5'-нуклеотидазою. Концентрацію загального білка в пробах визначають за методом Лоурі.

Вміст іонів калію і натрію в крові та тканинах визначають методом полум'яної фотометрії. Гепаринізовану кров розділяють на плазму і еритроцити центрифугуванням (10 хв при 1500 об./хв), тканини (100 мг) висушують при температурі  $104^\circ\text{C}$  у термостаті до постійної маси, потім подрібнюють і екстрагують 48 год в 1N  $\text{HNO}_3$ . Екстракт центрифугують 15 хв при 1500 об./хв і в супернатанті визначають вміст іонів.

Внутрішньо/зовнішньоклітинну концентрацію електrolітів розраховують за формулою Benson et al. [22].

### 3.2.4. Вивчення впливу на показники мікросомального окислення в печінці

При доклінічному вивченні потенційних геропротекторних засобів важливе значення має їх вплив на активність ферментів системи мікросомального окислення печінки, оскільки від її стану залежить швидкість метаболізму ендogenous та екзогенних хімічних сполук [23].

Показано, що при старінні знижується активність ферментів мітосомального окислення, а також здатність їх до генетичної індукції [24]. Тому підвищення активності цих ферментів в ендоплазматичному ретикулумі печінки старих тварин за умов введення загальноприйнятих індукторів системи (барбітуратів) на тлі досліджуваних засобів може бути свідченням геропротекторної дії останніх.

Для оцінки монооксигеназної системи печінки в мітосомальній фракції гепатоцитів визначають вміст цитохрому P-450 – ключового ферменту цієї системи, цитохрому b<sub>5</sub>, N-деметилазу і p-гідроксилазу активності, вміст мітосомального білка, ваговий коефіцієнт печінки.

Мітосомальну фракцію виділяють з гомогенату тканини печінки за методом І.І.Карузіної і А.І.Арчакова [13]. Вміст цитохромів P-450 і b<sub>5</sub> вимірюють на реєструючому спектрофотометрі і розраховують за молярним коефіцієнтом екстинкції [13].

p-гідроксилазу активність визначають за кількістю утвореного пара-амінофенолу, а N-деметилазу активність – за кількістю формальдегіду, утвореного в реакції деметилювання амідопіріну [13]. Кількість і активність ферментів розраховують на мг мітосомального білка, який визначають за методом Лоурі. Розраховують ваговий коефіцієнт печінки:

$$\text{ВКП} = \frac{\text{маса печінки}}{\text{маса тіла}} \cdot 100$$

Для оцінки індуктивного ефекту досліджуваного засобу тваринам вводять в/о фенобарбітал натрію в дозі 80 мг/кг, триразово з інтервалом 24 год. Протягом 24 год після останньої ін'єкції фенобарбіталу натрію тварини голодують (одержують тільки воду), потім їх декапітують і забирають тканину печінки для досліджень.

Особливо слід підкреслити, що при вивченні впливу нових засобів на активність ферментів монооксигеназної системи необхідно враховувати статеві, лінійні і видові відмінності.

Інтегральним фізіологічним показником активності монооксигеназної системи печінки є тривалість наркотичного сну, викликаного введенням барбітуратів. В експериментальних дослідженнях на щурах встановлене лінійне збільшення гексобарбіталового сну з віком.

Дослідження проводять згідно з методичними рекомендаціями [25]. Щурам в/о вводять 1–2% розчин гексобарбіталу з розрахунку 80 мг/кг маси тіла.

Мишам вводять 1–2% розчин гексобарбіталу в/в з розрахунку 40–50 мг/кг. Реєструють тривалість наркотичного сну за часом перебування тварини в «боковому» положенні.

### 3.2.5. Вивчення впливу на показники ендокринної системи

У процесі старіння відбуваються кількісні і якісні зміни в гормональних регуляторних системах, які майже завжди ведуть до зниження адаптаційних і компенсаторних можливостей фізіологічних систем організму.

При доклінічному вивченні геріатричних засобів в умовах їх хронічного застосування з досліді повинні бути виключені тварини, у яких виявлені морфологічні та гістологічні зміни щитовидної залози, надширкових залоз і гонад. За умов гострої і хронічної дії препаратів не повинні спостерігатись відхилення в рівнях цукру крові за межі фізіологічних коливань.

Серед численних гормональних агентів, що впливають на темп і характер старіння, особливе місце займають статеві гормони, концентрація яких в крові знижується з віком. Враховуючи широкий спектр впливу статевих стероїдів на метаболізм, функціональний стан органів і систем старіючого організму, слід вивчати вплив лікарських препаратів на стан статевих залоз. В експерименті у самок для оцінки функції яєчників вивчають естральний цикл, концентрацію естрадіолу і прогестерону в периферичній крові. У самців функціональну активність статевих залоз оцінюють за концентрацією тестостерону в плазмі крові і тканині сім'яників. Визначення гормону проводять радіоімунологічним методом за допомогою стандартних наборів реактивів.

В процесі старіння спостерігаються виразні зміни андрогенної, глюкокортикоїдної і мінералокортикоїдної функції кори наднирників. В план експериментального вивчення геріатричних препаратів повинні бути включені методики, які характеризують вплив досліджуваних засобів на показники вказаних функцій кори наднирників.

Про вплив препаратів на функціональний стан кори наднирників свідчать маса органу, екскреція з сечею нейтральних 17-кетостероїдів, вміст кортикостерону в тканині надниркових залоз і в плазмі крові, вільних і зв'язаних його форм, а також зв'язуюча здатність білків крові.

### *3.2.6. Застосування функціональних навантажень*

Відомо, що вікові зміни нейрогуморальної регуляції, метаболічних процесів і функції обмежують адаптаційно-компенсаторні можливості організму, що особливо чітко виявляється за умов функціональних навантажень. Зокрема, встановлено, що при старінні в результаті гемодинамічних, метаболічних, функціональних змін знижується інтенсивність аеробних процесів і підвищується роль гліколітичного фосфорилування, компенсаторні можливості якого також знижені [26]. Це призводить до зміщення окисно-відновлювального потенціалу тканин, пошкодження клітинних мембран і посилює функціональні порушення систем старого організму, що особливо виявляється за умов, які вимагають мобілізації резервних механізмів, зокрема, при гіпоксії та фізичному навантаженні [27].

Функціональні навантаження (гіпоксія, фізичне навантаження) доцільно використовувати з метою оцінки ефективності нових геріатричних засобів, які спричиняють спрямовану нормалізуючу дію на фундаментальні механізми адаптації та енергозабезпечення виконуваної роботи.

Значні вікові зміни чутливості до медіаторів, гормонів та деяких груп лікарських препаратів обґрунтовують доцільність використання фармакологічних навантажень при вивченні активності нових лікарських засобів. В залежності від характеру препарату, що вивчається, для навантаження можуть бути використані різні фармакологічні чинники, по відношенню до яких спостерігається суттєва різниця чутливості молодих і старих тварин (гормони, барбітурати, катехоламіни та ін.).

## **3.3. Вивчення ефективності потенційних геріатричних засобів на моделях прискореного старіння**

### *Застосування експериментального опромінення*

Дослідженнями встановлено, що рентгенівське опромінення тварин в дозі 2 Гр викликає стійкі зміни у складі хроматину та синтезу білка у клітинах печінки, які за спрямованістю нагадують зміни, що відбуваються при прискореному старінні тварин [28].

Слід відзначити, що у тварин при опроміненні вказаною дозою спостерігаються характерні для спонтанного старіння зміни і з боку деяких інших показників, зокрема, інтенсивності процесів ПОЛ, внутрішньо/зовнішньоклітинного перерозподілу електролітів, мікросомального окислення тощо. Тому дана модель може бути використана для вивчення ефективності потенційних геропротекторних засобів за умов прискореного старіння.

У роботі використовуються білі щури віком 6-8 міс. Тварин опромінюють дозою 2 Гр на установці РУМ-17 (потужність дози 0,87 Гр/хв, при 15 мА, 180 кВ, фокусна відстань 40 см, фільтри Cu 0,5+ Al 1,0).

До експерименту одночасно включають: а) інтактних (неопромінених) тварин; б) опромінені тварин (контрольна група), в) опромінені, які одержують досліджуваний засіб – потенційний геропротектор. Ефективність геропротектору визначають за допомогою методів, описаних в розділі 3.2.

Інформативним є дослідження впливу препарату на структурно-функціональні показники генетичного апарату клітин печінки щурів. Для цього одержують ядра з профільтованого гомогенату печінки (1:10) в буфері, який містить 0,26 моль/л сахарози, 50 ммоль/л трис-НС1 (рН 7,5), 5 ммоль/л  $MgCl_2$ , 25 ммоль/л  $KCl$ . Очищують 1% тритоном X-100 в буфері, двічі відмивають і використовують для одержання хроматину, розподіленого на фракції методом електрофорезу в ПАГ. Фракції, які відрізняються за рівнем транскрипції та внутрішньоядерної локалізації, поділяють на транскрипційно активну, репресовану і зв'язану з ядерним матриксом та ядерною мембраною. У фракціях визначають вміст білків та ДНК. Відносний вміст фракцій (у % до ДНК) і відношення білок/ДНК у кожній фракції характеризують структурно-функціональний стан хроматину.

### **4. Особливості проведення фармакокінетичних досліджень геропротекторних засобів**

Вивчення фармакокінетики нових лікарських засобів на тваринах дає орієнтовне уявлення про розподіл препарату, дозволяє визначити перспективні шляхи введення лікарської речовини, прогнозувати спектр потенційних органотропних ефектів. Одержані фармакокінетичні дані можуть бути використані для прогнозування дії лікарської речовини на людину, для підбору орієнтовних доз та схем призначення, які будуть уточнені в процесі клінічних випробувань.

Експериментальні фармакокінетичні дослідження у старих тварин дозволяють визначити вплив саме віку на фармакокінетичні процеси, на відміну від досліджень у людей, де одночасно діють різні фактори, наприклад, наявність патологічних процесів, що спостерігаються, як правило, у літніх людей і можуть модифікувати кінетику ксенобіотиків.

Внаслідок фізіологічних і біохімічних змін, що настають з віком і впливають на фармакокінетику лікарських засобів, у старих тварин для більшості препаратів уповільнюються практично всі фармакокінетичні процеси: всмоктування, розподіл, метаболізм і екскреція.

Зміни у всмоктуванні пов'язані з віковим зниженням кислотності шлункового соку, зменшенням загальної поверхні слизової оболонки тонких кишок, кровотоку в кишечнику, змінами швидкості опорожнення шлунку, моторики кишечника та послабленням системи активного всмоктування.

При старінні змінюється розподіл ліків за рахунок змін проникності тканин, зниження зв'язування лікарських засобів з білками плазми (гіпоальбумінемія), що призводить до збільшення вільної фракції лікарських засобів, посилює їх дію на орган-мішень і прискорює виведення з організму. На розподіл впливають також зниження з віком кровотоку в органах та тканинах, збільшення відносної маси жирової тканини, зменшення внутрішньоклітинного вмісту води [29].

Зменшення з віком швидкості біотрансформації багатьох ліків пояснюється зниженням активності ферментів печінки, особливо оксидаз, та зменшенням печінкового кровотоку.

З віком знижується інтенсивність не тільки системного, але й пресистемного метаболізму, що призводить до збільшення біодоступності ліків з високим ефектом «первинного проходження» через печінку.

Виділення ліків з організму визначається, в основному, функцією нирок, яка поступово знижується з віком. Зміна маси нирок, кількості функціонуючих ниркових клубочків, швидкості клубочкової фільтрації і ниркового кровотоку призводять до сповільнення екскреції більшості ліків геропротекторної дії.

Дослідження фармакокінетики проводять на здорових інтактних тваринах однієї статі, обов'язково двох точно визначених вікових груп -дорослих і старих, за наведеною вище віковою класифікацією. Маса тіла не повинна відхилятися від нормального значення для відповідного віку більше, ніж на 10%.

Шляхи, методи, режим введення лікарських засобів, регламент фармакокінетичного експерименту, його тривалість, методи кількісного визначення концентрації ліків та опрацювання одержаних результатів проводяться, як і у дорослих тварин [30].

Звітна документація при дослідженнях фармакокінетики повинна мати відомості про використаних тварин: вид, лінія, стать, вік, маса тіла. Необхідно надати інформацію про спосіб введення препарату, дози, відбір біоматеріалу, докладно описати метод визначення концентрації препарату. Одержані дані наводяться у графічній формі; вказуються методи обрахунку параметрів фармакокінетики.

Лікарські речовини, що є природними метаболітами або ендогенними сполуками з немодифікованою хімічною структурою, не потребують фармакокінетичних досліджень.

## 5. Експериментальне вивчення нешкідливості потенційних геронпротекторних засобів

Вивчення нешкідливості геріатричних препаратів слід проводити згідно з існуючими вимогами щодо доклінічної оцінки нешкідливості фармакологічних засобів [31]. Враховуючи особливості фармакокінетики і фармакодинаміки лікарських засобів у старіючому організмі, всі дослідження, що характеризують нешкідливість, необхідно виконувати на старих тваринах.

Оскільки геронпротекторні лікарські засоби призначаються людям похилого і старечого віку, вважаємо за можливе не проводити дослідження їх фето-, ембріотоксичної і ембріолетальної, а також тератогенної дії.

## Література

1. Фролькіс В.В. Старение. Нейрогуморальные механизмы.– К.: Наукова думка, 1981.– 320 с.
2. Щорічна доповідь «Здоров'я населення України». МОЗ України, 1997.– 136 с.
3. Западнюк В.И. Геріатрическая фармакологія.– К.: Здоров'я, 1975.– 168 с.
4. Фролькіс В.В., Мурадян Х.К. Старение, еволюція и продление жизни.– К.: Наукова думка, 1992.– 336 с.
5. Дубина Т.Л., Разумович А.И. Введение в експериментальную геронтологию.– Минск: Наука и техника, 1975.– 168 с.
6. Методические рекомендації по изучению гиполіпидемических и протівоатеросклеротических средств/Горчакова Н.А., Малая Л.Т., Бобров В.А. и др.– К.: Фармкомитет МЗ України, 1996.– 28 с.
7. Schurr P.E., Schulz J.R., Parkinson T.M. Triton-induced hyperlipidemia in rats as an animal model for screening hypolipidemic drugs//Lipids.– 1972.– V.7, №1.– P. 68–72.
8. Лабораторные методы исследований в клинике (справочник)/Под ред. В.В.Меньшикова.– М.: Медицина, 1987.– 368 с.
9. Хайдукова И.А., Дворкин В.И., Малахов В.Н. Сопоставимость результатов определения  $\alpha$ -холестерина при разделении липопротеидов плазмы крови гепарин-марганцевой и магниево-вольфрамовой смесями//Лаб. дело.– 1976.– №11.– С. 687–688.
10. Солитернова И.Б., Никульчева Н.Г. Активность постгепариновой липопротеинлипазы плазмы крови кроликов//Вопр. мед. химии.– 1979.– №2.– С. 204–209.
11. Chapman M.J., Mills G.J. Characterisation of the serum lipoproteins and liver apoproteins in hypercholesterolaemic quinea-pigs//Biochem. J.– 1977.– V.167, №1.– P. 9–21.
12. Барабой В.А., Сутковой Д.А. Окислительно-восстановительный гомеостаз в норме и патологии/Под общ. ред. Ю.А.Зозули.– К.: Наукова думка, 1997.– 420 с.
13. Современные методы в биохимии/Под ред. В.Н. Ореховича.– М.: Медицина, 1977.– 290 с.

14. Гацко Г.Г., Мажуль Л.М., Позднякова Е.А. Перекисное окисление липидов в тканях крыс разного возраста в норме и при голодании//Бюлл. exper. биол. и мед.– 1982.– №4.– С. 30–32.
15. Чевари С., Андял Т., Штрэнгер Я. Определение антиоксидантных параметров крови и их диагностическое значение в пожилом возрасте//Лаб. дело.– 1991.– №10.– С. 9–13.
16. Beutler E., Duron O., Kelly B.M. Improved method for the determination of blood glutathione//Lab. Clin. Med.– 1963.– V.63, №5.– P. 882–888.
17. Olinescu R., Nita S. Influence of hemaproteins on glutathione peroxidase activity//Rev. Roum. Biochem.–1973.– V.10, №2.– P. 119–129.
18. Beutler E. Glutathione reductase: stimulation in normal subjects by riboflavin supplementation//Science.–1969.– V.165, №3893.– P. 613–615.
19. Рудакова И.Н., Шилина Н.К., Матюхова Н.П. Оценка антиоксидантной системы организма//Лаб. дело.– 1982.– №1.– С. 19–21.
20. Hennessy J.F. Vascular tissue (Na, K)-ATPase activity and aging in the rats//Mach. Ageing und Dev.–1988.– V.43, №2.– P. 153–159.
21. Kidwal A., Radcliffe J., Lee and Daniel E. Isolation and properties of skeletal muscle plasma membrane//Biochem. et biophys. Acta.– 1973.– V.298.– P. 593–607.
22. Benson E.U. et al. Distribution of fluid and electrolytes and concentration of actomyocin and other protein in the myocardium of dogs with chronic congestive//Am. J. Physiol.– 1956.– V.187.– №3.– P. 463–494.
23. Изменения фармакокинетики при старении и пути ее коррекции/Западнюк В.И, Кунраш Л.П., Заика М.У. и др.//Вестн. АМН СССР.– 1986.– №10.– С. 47–52.
24. Парамонова Г.И. Микросомальное окисление лекарственных веществ в печени при старении//Пробл. старения и долголетия.– 1991.– №2.– С. 192–203.
25. Простой специальный скрининг новых химических веществ (Метод.рекомендации)/Кондратюк В.И., Мохорт Н.А., Колодяжный В.И. и др.– К., МЗ Украины, 1985. 25 с.
26. Богацкая Л.Н., Стушина А.С., Калиман П.А., Парина Е.В. Особенности энергетического обмена и его регуляции в процессе старения//Геронтология и гериатрия. Ежегодник. Старение: механизмы, патология, образ жизни.– К., 1985.– С. 34–43.
27. Коркушко О.В., Чеботарев Д.Ф., Калиновская Е.Г. Гериатрия в терапевтической практике.– К.: Здоров'я, 1993.– 840 с.
28. Мозжухина Т.Г., Литошенко А.Я. Спосіб моделювання прискореного старіння (№ 97073849). Рішення про видачу патенту від 10.09.98.
29. Безверхая И.С. Фармакокинетика при старении.– К.: Здоров'я, 1990.- 168 с.
30. Методичні рекомендації по доклінічному вивченню фармакокінетики лікарських засобів/ Головенко М.Я., Безверха І.С., Жила В.А. та ін.– К., 1995.– 28 с.
31. Правила доклинической оценки безопасности фармакологических средств (GLP)/ РД 64–126–91.–М., 1992.– 78 с.



## ДОКЛІНІЧНЕ ДОСЛІДЖЕННЯ СТРЕСПРОТЕКТИВНОЇ ДІЇ ФАРМАКОЛОГІЧНИХ ЗАСОБІВ

Дев'яткіна Т.О.,  
Важнича О.М.,  
Луценко Р.В.

### Перелік скорочень

**АКТГ** – адренокортикотропний гормон  
**АТ** – артеріальний тиск  
**ГГНС** – гіпоталамо-гіпофізарно-надниркова система  
**ЕБС** – емоційно-больовий стрес  
**ЕДТА** – етилендіамінтетраацетат  
**ЕКГ** – електрокардіографія (електрокардіограма)  
**ЗАС** – загальний адаптаційний синдром  
**11-ОКС** – 11-оксикортикостероїди  
**ПОЛ** – перекисне окислення ліпідів  
**ТБК** – тіобарбітурова кислота  
**ТХО** – трихлороцтова (кислота)  
**САС** – симпатико-адреналова система  
**СОД** – супероксиддисмутаза  
**ФЗ** – фармакологічний засіб

### Вступ

Представлені методичні рекомендації підготовлені з метою уніфікації методичних підходів до оцінки стреспротективної дії фармакологічних засобів (ФЗ). Пропонується застосування єдиної програми досліджень, яка ґрунтується на відтворенні стандартних експериментальних моделей та комплексному визначенні доступних загально-соматичних, цитологічних, біохімічних і функціональних показників з наступним проведенням системного аналізу.

Методичні рекомендації за такою темою видаються вперше і адресовані спеціалістам науково-дослідних лабораторій і кафедр медичних та фармацевтичних вузів, які розробляють засоби фармакологічної регуляції стресу.

### 1. Загальні вимоги до стреспротективних засобів та їх вивчення

Фармакологічна корекція стресу – новий напрямок пошуку і використання лікарських засобів, спрямований на обмеження негативного впливу на організм надзвичайних факторів різного походження. Такі препарати є необхідними для профілактики і лікування наслідків екологічних і техногенних катастроф, бойових дій, оперативних і стоматологічних втручань. Вони можуть використовуватися за будь-яких ситуацій, що викликають психоемоційний стрес та напруження механізмів адаптації.

Стреспротективні засоби – це ФЗ, які послаблюють вплив стресорів на організм, сприяють нормалізації порушених функцій і, тим самим, забезпечують попередження «хвороб адаптації».

До стреспротективних препаратів можуть бути віднесені різноманітні ФЗ, неоднорідні за хімічною структурою і механізмом дії. Зокрема, захисні властивості при стресі мають нейролептики, транквілізатори, седативні препарати, ноотропи, регуляторні пептиди, блокатори  $\alpha$ - і  $\beta$ -адренорецепторів, природні і синтетичні антиоксиданти та ін.

Загальними вимогами до ФЗ стреспротективної дії є:

- поліфункціональність, тобто ефективність при різних видах стресу;
- здатність підсилювати природні стрес-лімітуючі системи;
- мінімальний вплив на організм у звичайних умовах;
- можливість термінового звернення;
- захисна дія на людей, які перебувають у стані стресу.

При вивченні стреспротективних засобів виникають труднощі, пов'язані з різноманітністю цих препаратів, відсутністю стандартних моделей стресу, препарату порівняння та загальноприйнятих критеріїв оцінки стреспротективної дії. Оскільки стрес є реакцією цілісного організму, то й захисна дія ФЗ може оцінюватись лише на системному рівні. Це потребує комплексного дослідження певного кола процесів і застосування математичних методів системного аналізу.

Пропонується уніфікувати методичні підходи до вибору експериментальних моделей, матеріалів і методів, які застосовують при доклінічному вивченні нових ФЗ – потенційних стреспротекторів.

Результати експериментів з доклінічного вивчення стреспротективної дії біологічно активних речовин і препаратів повинні бути статистично обробленими, представленими у вигляді таблиць і графіків. Оформлення звітної документації здійснюється згідно із загальноприйнятими нормами.

## **2. Лабораторні тварини і моделі стресу**

### **2.1. Лабораторні тварини**

Виявлення стреспротективних властивостей ФЗ можливе лише в дослідях *in vivo*, оскільки стрес є системною реакцією організму. В експериментах рекомендується використовувати білих щурів і мишей. Дослідження зручно проводити на безпородних білих щурах або щурах лінії Вістар. З метою усунення впливу коливань гормонального фону рекомендується використовувати тварин-самців. Бажано, щоб розбіжність у масі тварин не перевищувала 15%. Вивчення стреспротективних властивостей ФЗ на типованих групах тварин, а також на лінійних тваринах з певним рівнем чутливості до стресу доцільно практикувати лише на завершальних етапах розширеного дослідження. Контрольні і експериментальні групи мають бути достатньо репрезентативними (не менше 10 тварин у групі).

Тварин утримують у стандартних умовах віварію. Вони повинні одержувати повноцінний збалансований раціон і воду за потребою. Слід уникати перенаселення кліток, немотивованих переміщень тварин з однієї клітки до іншої, що провокує зоосоціальні конфлікти. Перед відтворенням гострого стресу застосовують харчову депривацію, не обмежуючи тварин водою. Експерименти проводять з урахуванням циркадних біоритмів. Зокрема, при відтворенні хронічного стресу щоденний вплив подразника повинен припадати на певний час доби.

Тварин умертвляють під неінгаляційним наркозом (тіопентал-натрій або гексенал у дозі 50 мг/кг маси тіла, внутрішньоочеревинно) шляхом забору крові з серця до його зупинки. Може бути застосований будь-який інший загальноприйнятий спосіб евтаназії.

### **2.2. Моделі стресу**

Відомо 2 види стресу: соматичний (біологічний) стрес – реакція на безпосередній вплив подразника на покриви тіла та психоемоційний стрес – реакція організму, яка розвивається

внаслідок дистантної рецепції. У тварин, здебільшого, моделюють перший вид стресу. Описано численні моделі стресу, які відрізняються природою подразника (фізичні, хімічні, біологічні, зоосоціальні), його силою (слабкі, середньої інтенсивності, сублетальні, летальні) та тривалістю (гострий, підгострий, хронічний стрес).

Найбільш придатними для вивчення стреспротективної дії ФЗ є класичні моделі гострого стресу, які легко відтворюються, характеризуються помірною інтенсивністю стресогенного впливу і стандартністю, а також відповідають умовам гуманного ставлення до лабораторних тварин та їх використання в експерименті. Для цих моделей добре відома тривалість стадій загального адаптаційного синдрому (ЗАС).

Використання хронічного стресу рекомендується на завершальному етапі розширеного дослідження.

#### Модель перово-м'язового напруження за Сельє [8]

Тварин іммобілізують на операційному столику на спині, атравматично фіксуючи за кінцівки. Тривалість іммобілізації – 3 год. Дослідження проводять через 2 год після завершення дії стресорного фактора. Стадія тривоги припадає на перші 12 год від початку стресу, стадія резистентності – на період з 12 до 48 год.

#### Емоційно-больовий стрес (ЕБС) [22]

З метою відтворення гострого ЕБС щурів піддають дії електричного струму силою 5–6 мА протягом 5 год у спеціальній камері з двома платформами (велика і мала), у дно яких вмонтовані електроди. Електричні імпульси подають дозовано і стохастично. Коли струм подають на велику площадку, щури переміщуються на малу, на яку струм не надходить. Після вироблення рефлексу уникання короткі електричні удари подають на малу площадку. В інтервалі між ударами електричного струму тварини постійно знаходяться в напруженому очікуванні наступного подразнення, що створює різку тривогу з характерними вегетативними реакціями: тахіпное, тахікардія, екзофтальм, вокалізація, агресивна оборонна поза, потім – апатія. Стадія тривоги триває перші 12 год від початку стресу. Тварини підлягають евтаназії через 2 год після завершення дії стресорного фактору.

#### Хронічний ЕБС

Цей вид хронічного стресу базується на моделі гострого ЕБС. Стрес відтворюють протягом 18 діб. Щоденна тривалість впливу подразника – 3 год. Стадія тривоги при хронічному ЕБС має місце в перші 4 доби, з 5 по 14 добу реєструється стадія резистентності, після 15 діб – стадія виснаження.

Для дослідження стреспротективної дії ФЗ можуть бути використані й інші експериментальні моделі, однак вони мають бути валідовані. Працюючи з такими моделями, слід визначити особливості виявів окремих ознак ЗАС і тривалість його стадій (за динамікою гормонів, основних загально-соматичних та гематологічних показників, реакцією на додатковий подразник).

### **3. Дози, шляхи введення і схеми застосування фармакологічних засобів**

Пропонується вивчати ФЗ у середній терапевтичній дозі. Якщо вона не визначена, можна використовувати дози, кратні ЛД<sub>50</sub> (1/10; 1/100; 1/1000 ЛД<sub>50</sub>).

Оскільки віддаленою перспективою є застосування препарату в клініці, досліджують адекватні шляхи введення: пероральний, підшкірний, внутрішньом'язовий, внутрішньовенний, інтрапазальний. Обирають той шлях введення, який пропонується для клінічного використання. Можна також застосувати шлях введення, який дозволяє одержати найбільш виражений вплив на стресорні зрушення в організмі.

Вивчають профілактичну і лікувальну активність ФЗ при гострому стресі. В першому разі речовину вводять до початку дії стресору. Час обирають з огляду на фармакокінетику ФЗ. В

більшості випадків можна практикувати введення ФЗ за 30 хв до початку гострого стресу з наступним дослідженням ефектів через 2 год після завершення стресу. У другому разі засіб вводять безпосередньо після завершення стресорного впливу і досліджують терапевтичний ефект за 3–5 год. Профілактичне застосування при хронічному стресі передбачає одно- або кількаразове введення ФЗ перед початком стресорного впливу, лікувальне – одно- або кількаразове введення під час стресу.

### 4. План та етапи дослідження

У кожному досліді мають бути такі експериментальні групи.

1. Інтактні тварини.
2. Стрес.
3. Стрес із введенням ФЗ.
4. Стрес із введенням розчинника (якщо такий є).

Дослідження стреспротективної дії здійснюють у три етапи:

- 1) скринінгове дослідження;
- 2) розширене дослідження;
- 3) уточнююче дослідження.

Задача скринінгових досліджень – визначення наявності впливу ФЗ на загально-соматичні показники (тріаду Сельє).

Другий етап оснований на застосуванні тестів, котрі дозволяють виявити, на які ланки стрес-реакції діє ФЗ. Вибір методів на 2-му етапі дослідження ґрунтується на відомих даних про закономірний характер стресорних зрушень у системі крові [8], серцево-судинній системі [19], гормональній регуляції [15], поведінкових реакціях [18] та перекисному окисленні ліпідів (ПОЛ) [2].

Уточнююче доклінічне дослідження спрямоване на з'ясування механізмів дії ФЗ при стресі та додаткове обґрунтування зробленого раніше висновку про наявність стреспротективної активності.

### 5. Методи дослідження специфічної фармакологічної активності речовин, що вивчаються як стреспротективні засоби

#### 5.1. Дослідження загально-соматичних показників (скринінгове дослідження)

##### Визначення маси надниркових залоз і тимусу

Органи звільняють від зайвої сполучної та жирової тканини, зважують на торсійних вагах. Відносну масу обчислюють як відношення маси органу до маси тіла. Можна обчислювати також коефіцієнт маси (КМ) за формулою:

$$\text{КМ} = \frac{\text{маса органу}}{\text{маса тіла тварини}} \cdot 100$$

##### Визначення виразкоутворення в шлунку [5]

Шлунок розтинають поздовжнім розрізом вздовж малої кривизни, промивають проточною водою і досліджують слизову оболонку за допомогою збільшувального скла (x4; x8). Звертають увагу на рельєф слизової оболонки, наявність виразок, ерозій, крововиливів. Визначають розміри виразок. Гострі виразки мають округлу чи лінійну форму, неущільнені краї, часто містять гемосидерин. Можуть зустрічатись перфоративні виразки. Інформативними показниками є частота виразкоутворення – кількість тварин у групі, які мають виразки; а також множинність виразкоутворення – середня кількість виразок, що припадає на одну тварину.

В нормі в лабораторних тварин пошкодження слизової оболонки шлунка відсутні.

Гострий стрес супроводжується інволюцією тимусу, гіпертрофією надниркових залоз і утворенням виразок на слизовій оболонці шлунка.

Зменшення під впливом ФЗ виявів тріади Сельє вважають ознакою стреспротективної активності. Захисний ефект може виявлятися стосовно одного або двох компонентів тріади, що залежить від природи і механізму дії застосованого засобу. Такі ФЗ перспективні для подальшого розширеного дослідження.

## ***5.2. Дослідження впливу потенційних стреспротективних засобів на функціональні, біохімічні і морфологічні процеси в організмі тварин, підданих стресу (розширене дослідження)***

### *5.2.1. Дослідження впливу на лімфоїдні органи і кров*

#### *Цитологічне дослідження кісткового мозку і лімфоїдних органів [8]*

У шурів видаляють стегнову кістку, голкою роблять отвори в її кінцях. За допомогою шприца переносять кістковий мозок у фарфоровий тигель, вимиваючи стандартним об'ємом 5% оцтової кислоти. Готують суспензію, пропускаючи суміш через голку шприца. Краплю суспензії переносять у камеру Горяєва і підраховують кількість клітин у 5 великих квадратах. Загальну кількість каріоцитів обчислюють за формулою  $N_2 = (N_1 \cdot 50) \cdot V$ , де  $N_2$  – кількість клітин кісткового мозку в стегновій кістці;  $N_1$  – кількість клітин у 5 великих квадратах;  $V$  – об'єм суспензії в мкл.

Для підрахунку мієлограм роблять мазки нативного кісткового мозку, які фіксують і фарбують за методом Романовського-Гімза або за методом Паппенгейма.

Тимус та селезінку розділяють на 2–3 частини, роблять відбитки на предметному склі для підрахунку тимо- та спленоцитогам, які обробляють, як описано вище. Далі органи вміщують у пробірки, заливають стандартним об'ємом 5% розчину оцтової кислоти (5, 10 або 20 мл). Через 5–10 хв лімфоїдні органи виймають, подрібнюють у фарфоровій ступці до гомогенного стану, додають той же розчин оцтової кислоти і перемішують за допомогою шприца, пропускаючи суспензію через голки різного діаметру. Одержану суспензію розводять 5% розчином оцтової кислоти в 10 разів, після чого підраховують кількість клітин у 5 великих квадратах камери Горяєва і обчислюють загальну кількість каріоцитів в органі за формулою:  $N_2 = (N_1 \cdot 50 \cdot 10) \cdot V$ , де  $N_2$  – кількість клітин в органі;  $N_1$  – кількість клітин у 5 великих квадратах камери Горяєва;  $V$  – об'єм суспензії в мкл.

Гострий стрес, який слугує за патологічний фон, у перші 12 год від початку дії стресора, характеризується зменшенням загальної кількості каріоцитів у тимусі і селезінці. У тимоцитограмах через 2 год спостерігають збільшення частки великих тимоцитів та бластів, а в спленоцитограмах – зростання відсотку лімфоцитів розміром 4–8 мкм (Т- лімфоцити). В кістковому мозку зменшується вміст гранулоцитів і водночас зростає вміст лімфоцитів. З кінця першої доби від початку стресу продовжується клітинне спустошення тимусу. Цитоз селезінки відновлюється або збільшується, можуть виникати вогнища ектопічного гемопоєзу. В наступні дні розвивається гіперплазія кісткового мозку з максимумом на 5–6 добу, що супроводжується збільшенням загальної кількості каріоцитів, а також зростанням представництва молодих форм еритроїдних і гранулоцитарних клітин.

Нормалізація цитозу і клітинного складу лімфоїдних органів під впливом ФЗ є ознакою стреспротективної дії.

#### *Визначення загальної кількості лейкоцитів та лейкоцитарної формули крові [16]*

З метою визначення загальної кількості лейкоцитів 20 мкл крові вносять у пробірку з 0,4 мл 5% розчину оцтової кислоти. Вміст пробірки ретельно перемішують і заповнюють ним камеру Горяєва, чекають 1 хв зсідання лейкоцитів. Підрахунок виконують при малому збільшенні мікроскопу в затемненому полі зору в 100 великих квадратах. Знайдену кількість лейкоцитів помножують на 50, а також на 10<sup>6</sup>.

Лейкограму досліджують у мазках крові, фіксованих і пофарбованих за Романовським – Гімза або Панпенгеймом. Підрахунок проводять при великому збільшенні мікроскопу в тонких ділянках мазків, послідовно переміщуючи скло. Рекомендується визначати як відносну (%), так і абсолютну кількість окремих видів лейкоцитів.

Рання реакція на стрес (до 12 год від початку стресогенного впливу) характеризується розвитком нейтрофільного лейкоцитозу, лімфо- та еозинопенією, які найбільш виражені між 3-ю та 9-ю год після стресу, з подальшою нормалізацією до кінця першої доби.

Зменшення під впливом ФЗ виявів нейтрофіліозу, лімфо- та еозинопенії свідчить про його стреспротективну дію, зміни протилежного характеру – про поглиблення зрушень за рахунок подальшої активації симпато-адреналової (САС), гіпоталамо-гіпофізарно-надниркової систем (ГННС).

### *5.2.2. Дослідження впливу на функціональний стан серцево-судинної системи*

#### Визначення артеріального тиску (АТ) [9]

Вимірювання АТ щурів проводять під наркозом в а. carotis communis, в яку введено катетер. АТ реєструють за допомогою кімографічного методу з використанням пневматичного підсилювача, розділеного металевою мембраною на дві частини, одна з яких заповнена рідиною і з'єднана з катетером. Через другу частину пневматичного підсилювача повинно постійно подаватись повітря зі швидкістю 2 л/хв. АТ у сонній артерії дорівнює 13,3–17,3 кПа (100–130 мм рт.ст.).

Можуть бути використані реографічні та плетизмографічні методи реєстрації АТ в артеріях хвоста. АТ в цьому разі становить 11,5–17,1 кПа (86–128 мм рт.ст.).

#### Електрокардіографія (ЕКГ) [9]

Запис ЕКГ у щурів проводять під наркозом у II і III відведеннях за допомогою електрокардіографа будь-якого типу з електродами, пристосованими для роботи з дрібними лабораторними тваринами.

Розшифровуючи ЕКГ, враховують її особливості в білих щурів. Зубець Р майже завжди позитивний в II і III відведеннях. Величина  $P_2$  дорівнює 0,1–0,35 мВ, а  $P_3$  – 0,1–0,3 мВ. Їх тривалість становить 0,01–0,02 с. Зубець Q відсутній в усіх відведеннях. Інтервал PQ (до точки Q) дорівнює 0,04–0,05 с. Висота зубця  $R_2$  становить 0,3–0,85 мВ, а  $R_3$  – 0,35–0,7 мВ. Зубець S у II відведенні зустрічається в 10%, а в III – в 37,5% випадків. Інтервал ST відсутній. Якщо є зубець S, він відразу переходить у зубець T. Тривалість комплексу QRS дорівнює 0,01–0,025 с. Зубець T завжди позитивний, його висота:  $T_2$  – 0,3–0,7 мВ;  $T_3$  – 0,35–0,65 мВ, тобто близька до такої в зубця R. Тривалість QRST 0,07–0,1 с. Інтервал TP (діастолічна пауза) може бути відсутній або становить 0,01–0,05 с.

Частоту серцевих скорочень у білих щурів доцільно визначати на основі електрокардіограми.

Для стадії тривоги гострого стресу характерне збільшення частоти серцевих скорочень, розвиток аритмій (синусова аритмія, екстрасистолія), підвищення АТ. Нормалізація ритму серцевої діяльності і АТ характерні для стреспротективної дії ФЗ.

### *5.2.3. Дослідження впливу на функціональний стан гіпоталамо-гіпофізарно-надниркової та симпато-адреналової систем*

#### Визначення АКТГ і кортикостерону

Визначення АКТГ і кортикостерону проводять за допомогою радіоімунного аналізу, використовуючи стандартні набори реактивів і керуючись інструкціями фірми-виробника.

#### Визначення 11-оксикортикостероїдів (11-ОКС) [20]

Принцип методу: кортикостероїди, що мають гідроксильні групи при 11-му і 21-му вуглецевому атомах після обробки проб сумішшю концентрованої сірчаної кислоти і етилового спирту здатні флуоресціювати.

Хід визначення. Робота потребує спеціально підготованих реактивів.

1) Гексан, двічі перегнаний у колбі з дефлегматором; 2) метиленхлорид або хлороформ (хлороформ для наркозу не потребує додаткового очищення); 3) 0,2 N розчин натрію карбонату; 4) абсолютний етиловий спирт, двічі перегнаний; 5) концентрована сірчана кислота, яка витримує пробу Саваля; 6) суміш концентрованої сірчаної кислоти і етилового спирту (3:1); 7) стандартні розчини гідрокортизону та кортикостерону. При визначенні 11-ОКС використовують дві стандартні проби: перша в 100 мл розчину містить 20 мкг гідрокортизону і 5 мкг кортикостерону (25 мкг%), друга – 40 мкг гідрокортизону і 10 мкг кортикостерону (50 мкг%). Стандартні проби готують так: завис кортикостероїдів розчиняють в 10–15 краплях етанолу, об'єм доводять водою до необхідної концентрації і зберігають у холодильнику.

У ході дослідження 2,0–2,5 мл крові збирають у пробірку з гепарином. Плазму відділяють центрифугуванням при 3 000 об./хв протягом 20 хв. У вимірвальну пробірку з притертою пробкою вміщують 1 мл плазми і додають 3 мл гексану. Після енергійного струшування протягом 1 хв гексан відсмоктують піпеткою, а його залишок видаляють відгонкою у вакуумі на водяній бані при температурі 40°C. До плазми доливають 10 мл метиленхлориду або хлороформу і після струшування протягом 1 хв плазму відсмоктують таким же чином, що і гексан. Екстракт промивають спочатку 0,5 мл 0,2 N розчину натрію карбонату (1 хв), потім 0,5 мл дистильованої води (1 хв), які відсмоктують пастерівською піпеткою, з'єднаною з вакуумним насосом.

Екстракт метиленхлориду і хлороформу (8 мл) переносять у чисту пробірку об'ємом 12–20 мл з притертою пробкою, додають 2,5 мл (або інший об'єм, необхідний для заповнення кювети) суміші концентрованої сірчаної кислоти і етилового спирту (3:1), приготованої перед застосуванням. Після струшування протягом 1 хв метиленхлорид (хлороформ) видаляють і через 1 год флуоресценцію проб вимірюють флуориметром. Для підготовки контрольної проби замість плазми крові беруть 1 мл води. Як контроль можна використовувати також чисту кислотну-етанолову суміш. Флуориметрія здійснюється при двох довжинах хвилі: 475 нм – для збудження флуоресценції і 530–550 нм – для виділення максимуму спектрофлуоресценції. Розрахунок проводять за формулою:

$$X = \frac{F_d}{F_{ст}} \cdot C_{ст} ,$$

де  $X$  – концентрація кортикостероїдів у плазмі крові, мкг%;  $F_d$  і  $F_{ст}$  – флуоресценція дослідної і стандартної проб;  $C_{ст}$  – концентрація кортикостероїдів у стандартній пробі, мкг %.

#### Визначення адреналіну і норадреналіну [14]

Принцип методу ґрунтується на тому, що білки тканин осаджують ТХО кислотою, яка одночасно екстрагує катехоламіни. Катехоламіни адсорбують гідроксидом алюмінію, окислюють йодом при різних значеннях рН. При рН 4,4 окислюється тільки адреналін, при рН 7,2 адреналін і норадреналін. Флуоресценцію адренолютину і норадренолютину, які утворюються при обробці катехоламінів йодом і лугом, вимірюють на флуориметрі.

Хід роботи. При визначенні користуються такими реактивами. 1) 10% розчин ТХО кислоти; 2) насичений водний розчин амонію сульфату; 3) 4-, 10- і 30% розчини натрію гідроксиду; 4) гідроксид алюмінію, який готують, розчиняючи 50 г алюмоаміачних галунів у 400 мл води, додаючи краплями 40 мл 25% розчину натрію гідроксиду. Відділяють осад фільтруванням, промивають та ресусцензують його в 200 мл бідистильованої води; 5) розчин фенолфталеїну лужний; 6) розчин натрію гідроксиду в бідистильованій воді, рН 8–8,5; 7) 1 N розчин сірчаної кислоти; 8) 0,01 N розчин йоду (готують перед застосуванням з 0,1 N розчину); 9) 0,1 N розчин натрію гіпосульфїту; 10) 8% розчин хлорної кислоти ( $\text{HClO}_4$ ); 11) 50% розчин натрію ацетату, рН 7,2; 12) ацетатний буфер, рН 4,4; 13) свіжовиготовлений розчин аскорбінової кислоти; 14) 1 N розчин соляної кислоти; 15) 0,1% розчини адреналіну і норадреналіну (10 мг розчиняють у 4 краплях 1 N розчину соляної кислоти і доводять бідистильованою водою до 10 мл; робочі розчини готують у

день аналізу розведенням у бідистильованій воді, додаючи 2–3 краплі 1 N розчину соляної кислоти на кожні 100 мл води; 16) бідистильована вода; 17) ЕДТА; 18) 0,9% розчин натрію хлориду.

Осадження білків і екстракцію катехоламінів проводять на холоді (на льоду). Тканину (400–800 мг) розтирають у ступці з 5–10 мл 10% ТХО кислоти із скляним порошком і додають ту саму кислоту до розведення 1:100, гомогенат розміщують скляною паличкою протягом 30 хв і фільтрують через паперовий фільтр. Екстракт розводять бідистильованою водою у співвідношенні 1:10, підкислюючи, як при приготуванні стандартних розчинів. Паралельно ставлять контроль на реактиви без тканин.

5–6 мл крові збирають в охолоджену льодом центрифужну пробірку, яка містить краплю гепарину, 10 мг ЕДТА і 1 мл 0,9 % розчину натрію хлориду. До суміші додають такий же об'єм 8% хлорної кислоти. Пробірку тримають на льодовій бані протягом 30 хв, періодично перемішуючи вміст скляною паличкою. Екстракт відділяють центрифугуванням протягом 10 хв при 3500 об./хв і 4°С.

У центрифужні пробірки вносять по 5 мл екстракту, 1 мл попередньо збовтаного алюмінію гідроксиду, 3 краплі насиченого розчину амонію сульфату і краплю воднолужного розчину фенолфталеїну. До суміші додають краплями 4% розчин їдкого натру до слабо-рожевого забарвлення, розмішуючи скляною паличкою. Проби центрифугують, надосад видаляють. Осад двічі промивають розчином їдкого натру, далі до нього доливають 10 мл бідистильованої води і 0,2 мл розчину сірчаної кислоти. Суміш перемішують скляною паличкою, центрифугують, елюати переносять порціями по 1–2 мл в пробірки з міткою на 10 мл (проби 1–4). Одночасно обробляють і контроль на реактиви.

Для окислення адреналіну в адренохром у пробу додають 5 крапель розчину йоду і 1 мл ацетатного буферного розчину, рН 4,4. Суміш струшують і точно через 30 с додають 4 краплі розчину натрію гіпосульфату. Пробу залишають на 3–5 хв. Так чинять з пробами 1,2,3. За цей час обробляють пробу 4: додають 5 крапель розчину йоду і 0,5 мл розчину натрію ацетату, струшують і точно через 30 с додають 4 краплі розчину гіпосульфату, після чого залишають на 3–5 хв. Внаслідок такої обробки окислюються адреналін і норадреналін. Далі в пробу 1 додають 3 краплі 30% розчину натрію гідроксиду, доводять бідистильованою водою до 10 мл і перемішують скляною паличкою. При цьому за 6–7 хв відбувається руйнування адреналіноподібних речовин. До проб 2, 3, 4 додають по 5 крапель розчину аскорбінової кислоти, струшують, швидко додають по 3 краплі 30% розчину їдкого натру, доводять бідистильованою водою до 10 мл і перемішують. Проба 2 містить продукти окислення, які можуть потрапити до елюату з тканини або крові. Обробку проб лугом проводять, за можливістю, одночасно.

Всі проби перед флуориметрією опромінюють 3 хв ртутно-кварцовою лампою для посилення флуоресценції. Інтенсивність флуоресценції вимірюють на довжині хвилі 505 нм при збудженні 410 нм.

Неспецифічну флуоресценцію речовин «неадреналінової» природи обчислюють як різницю між інтенсивністю флуоресценції проби 1 і контролю на реактиви. Різниця між пробою 2 і пробою 1 характеризує вміст у зразках біоматеріалу продуктів окислення адреналіну і норадреналіну ендогенного походження. Вміст адреналіну обчислюють за різницею показників проби 3 і проби 2, вміст норадреналіну – за різницею між пробою 4 і пробою 3. Абсолютний вміст катехоламінів знаходять за попередньо побудованим калібрувальним графіком для стандартів адреналіну і норадреналіну з урахуванням розведення під час осадження білків та елюювання.

### Морфологічне дослідження гіпоталамусу, гіпофізу та надниркових залоз [12,13].

Вилучені органи фіксують у 10% розчині нейтрального формаліну, у 2,5% розчині глутаральдегіду (для подальшого приготування напівтонких та ультратонких зрізів) або заморожують для приготування зрізів.

Подальшу обробку експериментального матеріалу проводять з використанням забарвлення зрізів гематоксилін-еозином, а напівтонких зрізів – толуїдиновим блакитним. Застосовують



також гістохімічні методи (забарвлення на ДНК та РНК, мукополісахариди, ліпіди, аскорбінову кислоту).

Описуючи гістологічні препарати гіпоталамусу, відмічають збереженість його структури, співвідношення функціонуючих та нефункціонуючих клітин, а також клітин із незворотними дистрофічними явищами. Звертають увагу на стан мікроциркуляторного русла.

В аденогіпофізі відмічають будову паренхіми, її кровонаповнення, розміри клітин та їх ядер, співвідношення аденоцитів (хромофобних, ацидо- та базофільних), наявність вакуолізації та специфічних гранул, характер колоїду та розміри фолікулів проміжної частки. В нейрогіпофізі звертають увагу на кількість нейросекреторних гранул, зміни їх тинкторіальних властивостей, кількість базофільних клітин, стан пітуїцитів.

У надниркових залозах описують вираженість і збереженість структури коркової і мозкової речовини, визначають співвідношення їх товщини [1]. Відмічають кровонаповнення синусоїдних капілярів. У корковому шарі звертають увагу на «прозорість» речовини, вираженість границь між зонами, кількість світлих (малоактивних) і темних (активних) клітин, клітин із деструктивними явищами, наявність цитолізу або вогнищевої гіперплазії. В мозковому шарі описують стан клітин та їх ядер, наявність цитолізу та лімфоїдно-клітинних інфільтратів.

При гострому стресі найбільш виражена активація ГГНС має місце в стадії тривоги. Відбувається зростання вмісту в плазмі АКТГ. Причому рееструють хвилеподібні зміни концентрації гормону (піки на 30-й хвилині і через 5 год від початку стресу). В крові збільшується вміст кортикостерону. Через 1,5 год від початку ЕБС рівень 11-ОКС зростає в 2 рази. Після 4-годинного ЕБС спостерігається підвищення цього показника з максимальним рівнем через 96 год. На перші 2 год гострого іммобілізаційного стресу припадає максимум гіперкатехоламінемії. Через 1,5 год від початку гострого стресу знижується вміст адреналіну і норадреналіну в надниркових залозах.

Морфологічні зміни в гіпоталамусі в перші 1,5 год від початку стресу свідчать про активне утворення і виведення гормонів. Збільшується число нейроцитів I типу (активно секретуючих), в аксонах та поблизу них – гранули нейросекрету. Останні також зустрічаються навколо судин та вздовж нервових волокон. Кількість клітин II типу (фаза спустошення) також збільшується, а нейроцитів III типу (фаза помірної секреції) – зменшується. Через 8 год відбувається подальше збільшення кількості нейроцитів I і II типу, однак у клітинах I типу зменшується вміст нейросекреторних гранул. З'являються двоядерні клітини, нейроцити з явищами дистрофії. Судини повнокровні. Через 24 год посилюються ознаки функціонального виснаження нейросекреторних клітин. Розміри клітин і ядер зменшені, вміст нейросекреторних гранул знижений.

У нейрогіпофізі в стадії тривоги швидко зменшується кількість нейросекреторних гранул, які слабо забарвлюються паральдегідфуксином. Через 24 год відмічають «плямистість» за рахунок порожнин на місці скупчень нейросекрету. Зникають тільця Герінга. Збільшується кількість базофільних клітин. Пітуїцити зберігають відростки, але їх ядра дрібні, гіперхромні.

В аденогіпофізі через 1,5 год від початку стресу спостерігається повнокров'я. Будова паренхіми компактна. Відмічається збільшення розмірів клітин та об'єму їх ядер. Співвідношення хромофобних, ацидофільних і базофільних аденоцитів не змінене. Зростає кількість вакуолізованих клітин. Колоїд проміжної частки набуває базофільного вигляду, розміри фолікулів зменшені. Через 8 год збільшується кількість базофільних аденоцитів, цитоплазма яких вакуолізована і дегранульована. Спостерігаються явища цитолізу. Цитоплазма ацидофільних клітин достатньо заповнена секреторними гранулами. Фолікули проміжної частки містять велику кількість вакуолізованого базофільного колоїду. Через 24 год і далі з'являється вогнищева дисконкомплексія клітин, дво- та трьохядерні секреторні клітини з дегранульованою цитоплазмою, вогнища проліферації хромофобних аденоцитів.

У надниркових залозах у перші 1,5 год на фоні повнокров'я паренхіми відмічаються поодинокі дрібні ділянки цитолізу в пучковій та клубочковій зоні. В пучковій зоні має місце деліпідація спонгіоцитів з перетворенням їх на темні еозинофільні клітини. Взагалі коркова речо-

вина лишається світлою, прозорою. Через 8 год повнокров'я синусоїдних капілярів зберігається. Збільшуються вогнища деліпідизації, знижується прозорість кори, стираються межі між зонами, збільшується кількість цитолізів. Ядра клітин збільшені, з гіпертрофічними ядрцями. Через 24 год ознаки гіперактивності зберігаються, кора має «плямистий» вигляд, зростає кількість клітин з явищами дистрофії, місцями спостерігаються ділянки дисконкомплексації клітин, стази, лімфоїдні інфільтрати.

Мозкова речовина в перші години стресу компактна, з вираженою базофілією. Межі клітин нечіткі. Ядра клітин великі, гіперхромні. Через 24 год відмічають розлади мікроциркуляції, дистрофічні явища, появу лімфоїдно-клітинних інфільтратів.

Для результатів гістохімічного дослідження надниркових залоз при стресі характерні деліпідизація, зниження вмісту РНК, аскорбінової кислоти, адренохрому (останнє – в мозковій речовині).

Виявом стреспротективної активності ФЗ є нормалізація рівня гормонів і зменшення морфологічних ознак підвищеної активності ГГНС і САС.

### 5.2.4. Дослідження впливу на функціональний стан центральної нервової системи

#### Вивчення поведінкових реакцій тварин у тесті «відкрите поле» [11].

Тест «відкрите поле» – це дослідження поведінки, зумовленої поміщенням тварини у незнайомий відкритий простір, втеча з якого неможлива.

Камера для цього тесту становить прямокутне поле 140x70 см, розділене на квадрати 10x10 см і освітлене лампою 100 Вт. У центрі певної кількості квадратів у довільному порядку в підлозі зроблені отвори («норки»). Передня частина камери прозора. Через неї проводиться спостереження. Тварину висаджують в центральний квадрат і фіксують латентний період виходу з нього. Критерієм переходу щура до іншого квадрату вважають переміщення через лінію, що розділяє квадрати, обох задніх кінцівок. Враховують також кількість квадратів, в які зайшла тварина (горизонтальна рухова активність), число підйомів на задні кінцівки («вертикальні стійки»), кількість «порок», які тварина обнюхала, кількість умивань (актів грумінгу), уринацій і дефекацій (кількість болюсів). За цими параметрами оцінюють рухову активність, орієнтовно-пізнавальну діяльність, тривожність і вегетативні реакції.

Гострий стрес викликає збільшення латентного періоду і часу перебування в центрі поля, змінює горизонтальну активність, збільшує вертикальну активність, посилює вегетативні реакції.

Вплив стреспротективних засобів на поведінкові реакції неоднозначний. Він залежить від природи і дози ФЗ. Оптимальним слід вважати нормалізацію поведінки стресованих тварин.

### 5.2.5. Дослідження впливу на процеси перекисного окислення ліпідів і антиоксидантного захисту

#### Визначення концентрації первинних продуктів ПОЛ [6].

Принцип методу базується на властивості гідропероксидів і дієнових кон'югатів поглинати ультрафіолетове випромінювання з максимумом при довжині хвилі 232 нм. Оптична густина розчину пропорційна концентрації дієнових кон'югатів у сироватці крові.

Хід визначення. На 1 мл сироватки обережно напаровують 0,3 мл 0,85% розчину натрію хлориду і центрифугують при 3 000 об./хв протягом 10 хв для видалення хіломікронів, що лишаються в верхньому шарі. З дна пробірки набирають 0,4 мл сироватки і додають до неї 4 мл кальцію хлориду, перемішують, додають 0,08 мл 1% розчину гепарину і знову ретельно перемішують. Пробірки, що містять комплекси ліпопротеїнів з гепарином, центрифугують при 3 000 об./хв протягом 10 хв. Супернатант видалюють, осад розчиняють у 3 мл 5% розчину натрію хлориду і спектрофотометрують при 232 нм проти води. За наявності високої екстинкції готують розведення 1:2; 1:4 і т.д. 5% розчином натрію хлориду. Концентрацію дієнових кон'югатів виражають в од.екстинкції/мл.

Визначення концентрації вторинних продуктів ПОЛ [7].

Метод базується на взаємодії вторинних продуктів ПОЛ, зокрема, малонового діальдегіду, з 2-тіобарбітуровою кислотою (ТБК), при цьому утворюється забарвлений комплекс, який екстрагується бутанолом.

Хід визначення. У пробірку з 3 мл 1,4% розчину ортофосфорної кислоти додають 0,25 мл сироватки (або 0,25 мл дистильованої води в «порожню» пробу) і 1 мл 0,48% розчину ТБК. Пробірки накривають конденсуючими ковпачками і вміщують у водяний термостат на 45 хв при 100°C. Після кип'ятіння пробірки охолоджують у холодній воді протягом 3–5 хв. Додають 4 мл н-бутанолу, інтенсивно струшують до утворення однорідної білої суспензії. Пробірки центрифугують 10 хв при 3 000 об./хв. Відразу після центрифугування відбирають 3 мл супернатанту в чисту суху пробірку. Оптичну густину вимірюють на спектрофотометрі при двох довжинах хвиль (535 і 570 нм) в кюветі 1 см. Вимірювання проводять не пізніше ніж через 1,5 год після центрифугування. Визначають поглинання в «порожній» пробі  $A_{\text{Д}} = A_{\text{Д}535} - A_{\text{Д}570}$  і в дослідній пробі  $A_{\text{П}} = A_{\text{П}535} - A_{\text{П}570}$ . Концентрацію ТБК-активних продуктів обчислюють за формулою:

$$\text{ТБК-активні продукти, мкмоль/л} = \frac{A_{\text{Д}} - A_{\text{П}}}{0,156} \cdot 16,$$

де 0,156 – коефіцієнт молярної екстинкції комплексу малонового діальдегід-ТБК у л/мкмоль/см; 16 – коефіцієнт розведення сироватки. Замість сироватки можуть бути досліджені інші біологічні рідини.

Визначення кінцевих продуктів ПОЛ (шиффових основ)[23].

Шиффові основи – це флуоресціюючі комплекси ліпопротеїнів, які входять до складу ліпофусцину і вважаються кінцевими продуктами ПОЛ.

Хід визначення. До зразка тканини масою 200 мг додають хлороформ-метанольну суміш (2:1, за об'ємом) у ваговому співвідношенні 20:1 і гомогенізують при температурі 45°C протягом 1 хв у системі скло-тефлон зі швидкістю 300 об./хв. Після цього до гомогенату додають рівний об'єм дистильованої води і інтенсивно струшують. Суміш центрифугують 1–2 хв при 300 об./хв, розбавляють невеликою кількістю метанолу із розрахунку 10:1 (за об'ємом) і проводять спектрофлуориметричне вимірювання. Ліпофусцинові хромофори, які екстраговані ліпідними розчинниками, мають характерні спектри флуоресценції з максимумами поглинання в області 260–280 і 340–375 нм і максимумами випромінювання в області 420–490 нм.

Визначення активності супероксиддисмутази (СОД) (пероксид: пероксид оксидоредуктаза КФ 1:15.1.1) [4].

В основі методу лежить здатність адреналіну самоокислюватись у лужному середовищі з утворенням супероксиданіон-радикалу. В присутності СОД ця реакція уповільнюється. Порівняння швидкості зазначених реакцій в контрольній і дослідній пробах дозволяє визначити активність ферменту.

Хід визначення. У пробірку з 0,5 мл трис-НСІ-буфера (рН 7,4) додають 0,5 мл крові, перемішують, додають 2 мл суміші для осадження гемоглобіну (етанол: хлороформ у співвідношенні 5:3), ретельно перемішують, герметично закривають і витримують при температурі – 4°C протягом 24 год. Проби центрифугують 30 хв при 3 000 об./хв. Визначають швидкість окислення адреналіну. Для цього в кювету на 1 см вносять 4,4 мл карбонатного буфера з рН 10,2, додають 0,1 мл супернатанту (або буфера в контрольну пробу) та 0,5 мл розчину адреналіну в розчині лимонної кислоти (в 100 мл дистильованої води міститься 192 мг лимонної кислоти і 333 мг адреналіну гідротартрату). За допомогою одноканального фотоелектроколориметра реєструють кінетику реакції в контрольному і дослідних зразках. Відлік часу починають з моменту внесення в кювету розчину адреналіну. Показники реєструють кожну

## Оцінка специфічної фармакологічної активності лікарських засобів

хвилину до припинення їх зростання. Обчислюють процент гальмування реакції за формулою:

$$T = \frac{E_K/t_K - E_D/t_D}{E_K/t_K} \cdot 100 \text{ ,}$$

де  $E_K/t_K$  і  $E_D/t_D$  – відповідно швидкості окислення адреналіну в контрольній і дослідній пробах. Тоді активність СОД в ум. од. становить  $A = T/100 - T$ .

### Визначення активності каталази (пероксид водню : пероксид водню оксидоредуктаза – КФ 1.11.1.6) [10]

Принцип методу ґрунтується на здатності пероксиду водню утворювати стійкий забарвлений комплекс з солями амонію.

Хід визначення. 0,1 мл сироватки крові або гомогенату тканин (100 мг на 1 мл 0,05 М трис-НСІ-буферу, рН 7,8) додають до 2 мл 0,03% розчину пероксиду водню. В «порожню» пробу вносять 0,1 мл дистильованої води. Реакцію зупиняють через 10 хв, додаючи 1 мл 4% розчину молібдату амонію. Екстинкцію визначають при 410 нм проти контролю на реактиви, куди замість пероксиду водню внесено 2 мл дистильованої води. Активність каталази сироватки обчислюють за формулою:

$$A = (E_{\Pi} - E_D) \cdot V \cdot t \cdot K_{\text{кат}}/л \text{ ,}$$

де  $A$  – активність каталази,  $E_{\Pi}$  і  $E_D$  – екстинкція «порожньої» та дослідної проб,  $V$  – об'єм внесеного зразка (0,1 мл),  $t$  – час інкубації (600 с),  $K$  – коефіцієнт, що дорівнює  $22,2 \cdot 10^3 \text{ ммоль}^{-1} \cdot \text{см}^{-1}$ .

### Визначення вільних токоферолів [3]

Визначення токоферолів у сироватці проводять спектрофлуориметрично після попереднього екстрагування гексаном.

Хід визначення. Реактиви потребують додаткової обробки. 96% станол очищують від альдегідів перегонкою з гідроксидом калію (20 г лугу на 1 л етанолу). Використовують лише середню фракцію. Гексан переганяють з дефлегматором при 68–69°C, струшують у ділильній воронці з 3–4 порціями концентрованої сірчаної кислоти (30 мл кислоти на 1 л гексану) доки кислотний шар не буде забарвлюватись. Залишки кислоти в органічному шарі нейтралізують 1 N розчином натрію гідроксиду (рН 6,0) і промивають бідистильованою водою. Гексан зневоднюють, пропускаючи через колонку з прожареною кремнісною кислотою. Знову переганяють при 68–69°C і використовують середню фракцію. Стандартний розчин DL- $\alpha$ -токоферолу готують і контролюють, виходячи з того, що 1% розчин DL- $\alpha$ -токоферолу при довжині хвилі 292 нм і товщині шару 1 см має поглинання 74,4.

В ході аналізу 0,1 мл сироватки (дослід), 0,1 мл бідистильованої води (контроль) або 0,05 мл стандартного розчину токоферолу змішують у пробірках з притертими пробками з 0,4 мл бідистильованої води, 0,6 мл насиченого розчину натрію хлориду і 1 мл етанолу. Перемішують, додають 2 мл гексану, щільно закривають пробками, струшують 20 хв і витримують 10 хв у холодильнику з метою повного розшарування. Верхній шар переносять у кювету спектрофлуориметра і вимірюють флуоресценцію при 320–325 нм, яка збуджується опроміненням з довжиною хвилі 292 нм. Вміст токоферолів обчислюють за формулою:

$$E = A \cdot (B - C)/(B - C)$$

де  $E$  – вміст токоферолів (мг/100 мл);  $A$  – вміст  $\alpha$ -токоферолу (мкг) в 0,05 мл стандартного розчину;  $B$ ,  $C$  – флуоресценція дослідної проби, стандарту і контролю відповідно.

### Методика визначення аскорбінової і дигідроаскорбінової кислот [21]

Принцип методу базується на тому, що відновлена аскорбінова кислота окислюється 2,6-дихлорфеноліндофенолятом натрію до дигідроаскорбінової кислоти. Остання при реакції з 2,4-динітрофенілгідразином утворює забарвлений продукт.

Вміст аскорбінової кислоти обчислюють за різницею між загальною і дигідроаскорбіновою кислотою.

Хід визначення. 500 мг тканини заливають 5–10 мл 5% розчину метафосфорної кислоти. Розтирають зі скляним піском. Переносять до центрифужної пробірки. Центрифугують 5 хв при 1500–2000 об./хв. Надосад видаляють. Осад промивають 2–3 рази 5–10 мл 5% розчину метафосфорної кислоти. Всі порції надосаду об'єднують і доводять об'єм до 25 мл. Контроль на реактив (без тканини) обробляють таким же чином.

У дві пробірки відміряють по 1,5 мл екстракту. В одну з них додають краплями 0,001 N розчин 2,6-дихлорфеноліндофеноляту натрію до появи слабко-рожевого забарвлення, стійкого протягом 30 с. В обидві пробірки додають по 0,5 мл 2% розчину 2,4-динітрофенілгідразину і доводять дистильованою водою до 2,5 мл. Інкують при 100°C протягом 10 хв. Охолоджують на льоду. В кожну пробірку додають по 2,5 мл 85% розчину сірчаної кислоти, охолоджуючи на льодовій бані після кожної порції кислоти. Через 1 год можна вимірювати екстинкцію проб при довжині хвилі 520 нм. Забарвлення стійке протягом 16–18 год. Для приготування стандарту аскорбінової кислоти до ряду пробірок вносять розчин аскорбінової кислоти (20 мг аскорбінової кислоти в 1 мл 5% метафосфорної кислоти) від 2 до 20 мкг і доводять метафосфорною кислотою до 1,5 мл. Далі обробляють, як дослідні проби.

Вміст дигідроаскорбінової кислоти в пробах 1 і 2 визначають за калібрувальним графіком. Вміст аскорбінової кислоти – за різницею вмісту дигідроаскорбінової кислоти в першій і другій пробах.

Гострий стрес характеризується періодами посилення та послаблення ПОЛ, які супроводжуються відповідними змінами антиоксидантного захисту і не співпадають за часом у різних органах. Строки розвитку фаз інгібування ПОЛ залежать від природи стресу. Зокрема, 2- або 3-годинна іммобілізація на спині в перші 1,5 год після завершення викликає інгібування процесів ПОЛ у крові. В динаміці ЕБС в перші 30 хв стресорного впливу ПОЛ знижується, через 120 хв – підвищується. Після ЕБС через 90–270 хв спостерігається підвищення ПОЛ, яке зберігається до 4–5 год. У фазі інгібування ПОЛ активність антиоксидантних ферментів, як правило, підвищена. Інтенсифікація ПОЛ і накопичення його продуктів може розвиватись на фоні підвищеної активності антиоксидантних ферментів (субкомпенсація антиоксидантного захисту) або зниження їх активності (декомпенсація антиоксидантного захисту).

### 5.2.6. Оцінка ефективності стреспротективної дії фармакологічних засобів

Оцінка ефективності стреспротективної дії здійснюється на основі кластерного аналізу (кількісної оцінки різниці об'єктів дослідження з урахуванням багатьох параметрів) [17].

Оскільки при дослідженні стреспротективних властивостей не існує відповідного препарату порівняння, за еталон, навколо якого формується перший кластер, приймають «умовну норму», тобто показники інтактних тварин. Він визначає рівень ефективності, який бажано досягнути.

Другий кластер формується з параметрів, що описують патологічний фон (стрес).

Для того, щоб досліджуваний ФЗ вважався ефективним стреспротективним засобом, потрібно, щоб він потрапив у один кластер з «умовною нормою». Це можливо, якщо різниця між сукупностями характеристик стану організму в нормі та при корекції стресу за допомогою ФЗ не перевищує прийнятого порогового значення (dAM).

$$dAM = \left\{ \sum_{i=1}^{i=n} \left( \frac{(x_i A - x_i M)}{s_i} \right)^2 a_i^2 \right\}^{1/2} - \left\{ \sum_{j=1}^{j=m} \left( \frac{(x_j A - x_j M)}{s_j} \right)^2 a_j^2 \right\}^{1/2}$$

де А – стан організму при застосуванні досліджуваного ФЗ; М – умовна норма, сукупність показників, що описує стан організму інтактних щурів; n – кількість показників, за якими при застосуванні препарату відбулася нормалізація; m – кількість показників, за якими препарат

А не усунув стресорні зрушення;  $x_i$  – позначення і-го показника,  $x_j$  – позначення j-го показника;  $a_i$  – коефіцієнт вагомості і-го показника серед інших параметрів;  $a_j$  – коефіцієнт вагомості j-го показника серед інших параметрів;  $s$  – середнє квадратичне відхилення показника і або j.

Визначають також різницю між кластером, який характеризує стан організму при стресі без корекції (В), і такому при введенні досліджуваного ФЗ (А).

Умовою того, що препарат А має стреспротективні властивості є співвідношення  $dAM > 0$ . Але при цьому потрібно, щоб ФЗ не потрапив до кластеру В, тобто повинна виконуватись умова  $dBM < 0$ .

При здійсненні кластерного аналізу обчислення виконують із використанням стандартних програм «STATISTICA».

### **5.3. Додаткові можливості вивчення стреспротективної дії фармакологічних засобів (уточнююче дослідження)**

Уточнюючому дослідженню піддають лише ті ФЗ, у яких виявлено стреспротективні властивості. На цьому етапі доцільно проводити дослідження ефектів у динаміці гострого стресу через 6, 9, 12, 24, 48 і 72 год від початку стресорного впливу, що дозволяє уточнити дію ФЗ на різних стадіях ЗАС.

Доцільним є проведення експериментів із використанням тварин, попередньо типованих за поведінковими реакціями в тесті «відкрите поле». Це дозволяє одержати більш стабільні показники по окремих експериментальних групах і водночас дає можливість простежити залежність ефектів ФЗ від індивідуальних спадкових особливостей тварин. З такою ж метою можуть бути проведені досліди на лініях тварин з підвищеною або характерною реакцією на стрес.

Рекомендується також вивчення ФЗ на моделі хронічного стресу.

У даному випадку слід враховувати наступні особливості патологічного фону. Тріада Сельє в повному обсязі спостерігається лише в стадії тривоги хронічного стресу. В цій стадії прогресивно знижується цитоз тимусу, в кістковому мозку збільшується вміст лімфоїдних клітин і зменшується вміст зрілих гранулоцитів. Водночас, цитоз кісткового мозку, цитоз селезінки, загальна кількість лейкоцитів у крові та лейкоцитарна формула крові істотно не змінюється. Концентрація продуктів ПОЛ в органах і крові знижена, спостерігається підвищення активності антиоксидантних ферментів. Рівень глюкокортикоїдів зростає на першу добу і має тенденцію до зниження наприкінці стадії тривоги хронічного стресу.

У стадії резистентності хронічного стресу зменшується вираженість загально-соматичних ознак стресу, зростає цитоз тимусу, збільшується цитоз кісткового мозку за рахунок клітин грануло- та еритроцитарного ряду. В крові має місце збільшення загальної кількості лейкоцитів. Відбувається посилення ПОЛ на фоні високої активності антиоксидантних ферментів.

У стадії виснаження хронічного стресу прогресує клітинне спустошення тимусу, зменшується цитоз кісткового мозку і загальна кількість лейкоцитів у крові за рахунок гранулоцитів і лімфоцитів. Вміст продуктів ПОЛ підвищений на фоні зниження активності антиоксидантних ферментів і вмісту низькомолекулярних антиоксидантів. Реєструються коливання рівня глюкокортикоїдів.

З метою визначення механізмів дії ФЗ зі стреспротективними властивостями рекомендується застосування фармакологічного аналізу, тобто дослідження ефектів речовин за умов блокади окремих ланок стрес-реалізуючих та стрес-лімітуючих систем.

Залежно від природи ФЗ доцільно додатково розширити відповідні розділи програми, рекомендованої на 2-му етапі досліджень. Зокрема, якщо вивчають стреспротективні властивості нейротропних засобів, потрібно дослідити вплив ФЗ на умовно-рефлекторну діяльність і складні форми поведінки, порушені стресом; провести запис та аналіз електроенцефалограми. Вивчаючи стреспротектори-антиоксиданти, слід розширити коло методів, які характеризують процеси ПОЛ і антиоксидантного захисту, дослідити зазначені процеси не тільки в крові та гомогенатах тканин, а й у субклітинних фракціях.

## Література

1. Автандилов Г.Г. Медицинская морфометрия.– М.: Медицина, 1990.– 384 с.
2. Барабой В.А., Сутковой Д.А. Окислительно-восстановительный гомеостаз в норме и патологии/Под общ. ред. Ю.А. Зозули.– К.: Наук. думка, 1997.– 420 с.
3. Блажеевич Н.В. Витамин Е//Теоретические аспекты науки о питании. Методы оценки обеспеченности населения витаминами. Т. VIII/Под ред. М.Н. Волгарева.– 1987.– С. 51–59.
4. Брусков О.С., Герасимов А.М., Панченко Л.Ф. Влияние природных ингибиторов радикальных реакций на автоокисление адреналина//Бюл. эксперим. биол. и мед.– 1976.– №1.– С. 33–35.
5. Виноградов В.М., Полонский В.А. Влияние нейропептидов на экспериментальную дуоденальную язву у крыс//Пат. физиол. и эксперим. терапия.– 1983.– Вып.1. – С. 3–6.
6. Воскресенский О.Н., Туманов В.А. Ангиопротекторы.– К.: Здоров'я, 1982.– 120 с.
7. Гаврилов В.Б., Гаврилова А.Р., Мажуль Л.М. Анализ продуктов перекисного окисления липидов в сыворотке крови по тесту с тиобарбитуровой кислотой//Вопр. мед. химии.– 1987.– Т.33, №1.– С. 118–122.
8. Горизонтов П.Д., Белоусова О.М., Федотова М.И. Стресс и система крови.– М.: Медицина, 1983.– 240 с.
9. Западнюк И.П., Западнюк В.И., Захария Е.А., Западнюк Б.В. Лабораторные животные. Разведение, содержание, использование в эксперименте.– К.: Вища шк., 1983.– 383 с.
10. Королюк М.А., Иванова Л.И., Токарев В.Е. Метод определения активности каталазы//Лаб. дело.– 1988.– №1.– С. 16–19.
11. Маркель А.Л., Хусаинов Р.А. Метод комплексной регистрации поведенческих и вегетативных реакций у крыс при проведении теста «открытое поле»//Журн. высш. нерв. деят.– 1976.– Т.26, №6.– С. 1314–1318.
12. Меркулов Г.А. Курс патогистологической техники.– Л.: Медгиз, 1969.– 422 с.
13. Пирс Е. Гистохимия теоретическая и прикладная. 2 изд.: Пер. с англ.– М.: Мир, 1962.– 962 с.
14. Резников А.Г. Методы определения гормонов: Справочное пособие.– К.: Наук. думка, 1980.– 400 с.
15. Робу А.И. Взаимоотношения эндокринных комплексов при стрессе.– Кишинев: Штиинца, 1982.– 208 с.
16. Руководство к практическим занятиям по клинической лабораторной диагностике/Под ред. проф. М.А. Базарновой; проф. В.Т. Морозовой.– К.: Вища шк., 1988.– 318 с.
17. Славин М.Б. Методы системного анализа в медицинских исследованиях.– М.: Медицина, 1989.– 304 с.
18. Суворова В.В. Психофизиология стресса.– М.: Медицина, 1975.– 240 с.
19. Федоров Б.М. Стресс и система кровообращения.– М.: Медицина, 1990.– 320 с.
20. Цюхно З.И., Славнов В.Н., Панченко Н.И. и др. Функциональные методы исследования в эндокринологии.– К.: Здоров'я, 1981.– 240 с.
21. Шпаков А.Е. К методике отдельного определения общей, редуцированной и дигидроаскорбиновой кислот//Лаб. дело.– 1967.– №5.– С. 305–306.
22. Desiderato O., Mackinnon H.L., Hissom G. Development of gastric ulcers in rats following stress termination//J. Compar. Physiol. Psych.– 1974.– V.87, №2.– P. 208–214.
23. Fletcher D.L., Dillard C.J., Tappel A.L.//Anal. Biochem.– 1973.– V.52, №1.– P. 1–9.

## ДОКЛІНІЧНІ ДОСЛІДЖЕННЯ СПЕЦИФІЧНОЇ АКТИВНОСТІ ТА НЕШКІДЛИВОСТІ МІНЕРАЛЬНИХ ВОД

Бабов К.Д., Громов Л.О., Нікішелова О.М.,  
Дмитрієва Г.О., Литвиненко А.Г., Алексеєнко Н.О.,  
Солодова Л.Б., Філіпенко Т.Г., Новодран О.В.,  
Решетняк В.В., Ніколенко С.І., Колкер І.А.,  
Насібулін Б.А., Павлова О.С., Олешко О.Я., Швалова О.В.

### Перелік скорочень

**АлАТ** – аланінамінотрансфераза;  
**АсАТ** – аспартатамінотрансфераза;  
**ГАМК** – гама-аміномасляна кислота;  
**ЕЕГ** – електроенцефалограма;  
**ЕКГ** – електрокардіограма;  
**ЕКоГ** – електрокортикограма;  
**ІНХ** – індекс насичення жовчі холестерином;  
**ПЕГ** – поліетиленгліколь;  
**ПОЛ** – перекисне окислення ліпідів;  
**СЖК** – сумарні жовчні кислоти;  
**СЩП** – спектральна щільність потужності;  
**Х** – холати;  
**ЦІК** – циркулюючі імунні комплекси;  
**ЦНС** – центральна нервова система;  
**ШКТ** – шлунково-кишковий тракт;  
**Fa** – фагоцитарна активність;  
**Fi** – фагоцитарний індекс.

### Вступ

Природні мінеральні води в останнє десятиріччя достатньо широко впроваджуються в амбулаторне, санаторно-курортне та позакурортне лікування як один з популярних немедикаментозних засобів терапії.

Головними фізико-хімічними характеристиками лікувальних мінеральних вод слід вважати загальну мінералізацію, аніонно-катіонний склад, вміст біологічно активних компонентів або сполук. Відповідно до вмісту основного аніону можна виділити три найпоширеніші типи мінеральних вод: гідрокарбонатні (типу «Поляна Квасова»), хлоридні (типу «Миргородська») і сульфатні (типу «Моршинська ропа № 6»).

**Гідрокарбонатні мінеральні води** нормалізують вуглеводний і білковий обмін, мають протизапальну дію, сприяють нормалізації жовчоутворювальної функції печінки і жовчовидільної функції біліарної системи. Мінеральним водам з переважним вмістом гідрокарбонатних аніонів притаманні чітка кислото-нейтралізуюча дія в шлунку та облужнюючий ефект у дванадцятипалій кишці.



Гідрокарбонати поліпшують засвоєння мікро- і макрослементів, що підвищує інтенсивність окислювально-відновлювальних процесів; посилюють діурез, чим сприяють вилученню шлаків.

Практично в усіх видах мінеральних вод наявні аніони **хлору**. Для них характерний стимулюючий вплив на початково знижену секреторну функцію шлунку, скорочувальну активність гладенької мускулатури органів травлення. При питному лікуванні іон хлору стимулює жовчовиділення, посилює дію сульфат-іонів, стимулює шлункову та панкреатичну секрецію, виділення ферментів кишечника. Він є також вихідним субстратом для утворення хлористоводневої кислоти шлункового соку, посилює моторику шлунку.

**Сульфати** в мінеральних водах зустрічаються у вигляді сірчаноокислих солей кальцію, натрію і магнію. Вони виявляють холекінетичну дію. Поступове скорочення жовчного міхура зменшує застій жовчі, покращує відток її з жовчних протоків і міхура. Мінеральні води, які містять сульфат-іони, значно збільшують холерез, поліпшують фізико-хімічні властивості жовчі, нормалізують холестериновий і білковий обмін. Експериментально доведено [12], що сульфат-іони беруть участь в трьох основних механізмах дії води на організм. Вони виявляють: 1) неспецифічну місцеву дію на слизову шлунку, 2) неспецифічну дію на тканини пошкодженого шлунку (шляхом підвищення соковідділення і кислотоутворення), 3) неспецифічну опосередковану дію на шлунок через щитоподібну залозу.

Основними катіонами, що входять до складу мінеральних вод, є натрій, калій, кальцій, магній.

**Натрій** відіграє важливу роль у регулюванні водно-сольового обміну, стимулює жовчоутворювальну і особливо жовчовидільну функції гепатобіліарної системи і секреторну функцію залоз травного тракту, посилює перистальтику кишок.

**Калій**, як і натрій, є основним мінеральним компонентом. Гідрокарбонати калію беруть участь у вуглеводному обміні, в процесах синтезу білку і ряду ферментативних систем, синтезу глікогену в печінці, яка є одним з основних депо калію. Іон калію посилює тонус і моторну функцію шлунку і кишок, регулює виведення хлористоводневої кислоти.

**Кальцій** має антисептичні і в'язучі властивості, він активує ряд ферментів, знижує проникність клітинних мембран (у т.ч. і гепатоцитів), децю посилює діурез, що важливо при наявності у хворих з патологією печінки синдрому оксиурії. Хлоридно-натрієві води, що містять кальцій, поліпшують ліпідний обмін внаслідок підсилення продукування печінкових фосфоліпідів.

**Магній** є складовою частиною міжклітинної і клітинної рідини, має жовчогінну дію, знижує рівень холестерину в крові, проявляє спазмолітичну і безпечнішу дію. Магній бере участь у важливих для клітинного метаболізму ферментативних процесах, зокрема, відкладаючись у м'язах, активує анаеробний обмін вуглеводів, бере участь в білковому обміні, процесах нервово-м'язової збудливості. Розчини солей магнію каталізують діяльність ряду ферментів травної системи – трипсину і ерипсину. Магній необхідний також для синтезу АТФ та таких важливих ферментів як холінестераза, холінацетилаза.

Мінеральні води, які містять біологічно активні мікроелементи та сполуки в кількості, не нижчій за бальнеологічні норми, прийняті для питних мінеральних вод, виділяються в окремі специфічні групи.

Терапевтична дія **залізистих мінеральних вод** обумовлена, передусім, кількістю та хімічною формою заліза, що надходить до шлунково-кишкового тракту.

Крім того, певний аніонно-катіонний склад води сприяє нормалізації моторної функції шлунку, стимулює жовчовиділення та процеси всмоктування в кишечнику [33]. Як відомо, для оптимального всмоктування заліза необхідне виділення нормального шлункового соку [20]. Цей фактор можна врахувати, підбираючи таку мінеральну воду, яка містить підвищену кількість заліза та стимулює секрецію шлунку [20]. Шляхом стимуляції надходження до кишечника жовчі можливо підвищити надходження до нього мукозного трансферину, що навантажується залізом, проникає в ентероцити, звільнюється від заліза і після цього вступає в новий цикл [32]. Потрібно вказати, що експериментально доведено існування залежності між забезпеченістю організму залізом та його всмоктуванням в травному тракті, але механізми цьо-

го явища вивчені недостатньо. Отже при поліпшенні процесів всмоктування в цілому покращується забезпеченість організму залізом.

**Миш'як у миш'яковистих вуглекислих водах** міститься, в основному, у вигляді миш'яквистої кислоти  $H_3AsO_4$ , що обумовлено відповідними окислювально-відновними процесами.

Життєва необхідність цього мікроелементу підтверджена експериментами на тваринах [29]. Експерименти, проведені в останні роки, сприяли формуванню сучасних уявлень про патологію арсенодефіцитних станів, що у тварин проявляється в тих або інших порушеннях репродуктивної сфери і в передчасній загибелі нащадків. Існування арсенодефіцитних станів у людини не доведено. Миш'яковисті вуглекислі води частіше за все застосовуються для зовнішніх бальнеопроцедур.

Миш'яковисті мінеральні води при внутрішньому застосуванні мають яскраво виражену профілактичну і меншою мірою лікувальну дію при променевих ураженнях. Санаторно-курортне лікування з застосуванням миш'яковистої мінеральної води дає високий лікувальний ефект при найбільш частих захворюваннях, патогенез яких пов'язаний з порушенням клітинного метаболізму, зокрема при атеросклеротичному коронарокардіосклерозі, гіпертонічній хворобі I-II А стадії, ревматизмі в неактивній фазі, порушенні функції яєчників на тлі хронічного аднекситу, гіпертиреозі, подагрі. Механізм лікувальної дії вод цієї групи при внутрішньому застосуванні мало вивчений. Встановлено, що миш'як, який міститься в мінеральній воді, проникає до організму, тривало в ньому затримується і справляє виражений вплив на функціональний стан печінки і травного каналу. Участь миш'яку в процесах кровотворення визначила призначення мінеральних вод, що містять його, хворим з різноманітними анеміями [20].

Фізіологічна функція **бору**, що надходить з мінеральними водами, полягає в регулюванні паратгормону і через нього – обміну кальцію, магнію, фосфору і холекальциферолу. Крім того, борним водам притаманні антимікробні властивості, які сприяють гальмуванню окислювальних процесів, що слід враховувати, призначаючи їх хворим на ожиріння.

Фізіологічна дія мінеральних вод, що містять **бром**, пов'язана з його впливом на гальмування процесів в нейронах кори головного мозку.

**Йод** є необхідним компонентом тканин щитовидної залози і виконує свою біологічну функцію як складова частина тиреоїдних гормонів. Йони йоду, як і бром, затримуються в печінці, тому водам, що містять йод, притаманний тривалий період післядії. Останнє пояснює лікувальну дію означених вод при останній патології печінки і біліарної системи з захворюваннями шлунка і кишечника. Мінеральні води, що містять йод, виявляють виражену фармакологічну дію, вони сприяють процесам регенерації, беруть участь в окислювально-відновних процесах, мають бактерицидну дію.

**Кремній** необхідний для нормального росту та розвитку організму, формування хрящів, кісткової і сполучної тканини, він бере участь у низці важливих метаболічних процесів. Фізіологічна роль кремнію при цьому пов'язана, в основному, із синтезом глікозаміногліканів і колагену. Однією з форм перебування кремнієвої кислоти в мінеральних водах є колоїдна, що поєднує адсорбційні, в'язучі, протизапальні, болезаспокійливі властивості цих вод.

Води з підвищеним вмістом **органічних речовин** посідають особливе місце серед лікувальних природних вод. Згідно з ДСТУ 878–93 «Води мінеральні питні. Технічні умови» мінеральні води можуть бути віднесені до цієї групи при вмісті органічних речовин від 5 до 30 мг/дм<sup>3</sup> (у перерахуванні на органічний вуглець). Оскільки лікувальна дія таких вод пов'язана з наявністю підвищеного вмісту органічних речовин, то присутність останніх є прямим показанням для проведення доклінічних і клінічних випробувань. Основну масу органічних речовин складають гуміни і бітуми [4]. Частіше за все в мінеральних водах містяться нафтені бітуми, які складаються з метанових, нафтенових, ароматичних вуглеводнів і кисеньвміщуючих, сірчистих та азотистих сполук. Нафтені кислоти і їхні солі також є біологічно активними речовинами. Доведено, що органічні речовини мають не лише позитивний, але й негативний вплив на функції організму. При вмісті органічних речовин в мінеральних водах понад 30 мг/дм<sup>3</sup> порушується кровообіг у печінці, що веде до погіршення її функції.

Крім лікувальної дії вод цього типу на гепатобіліарну систему, нирки і сечовивідні шляхи, слабкомінералізовані води з підвищеним вмістом органічних речовин також впливають на кислотоутворення в пилунку [26], водно-електролітний обмін [2, 3]. За існуючою концепцією [25], мінеральні води викликають гормономодельючий ефект на гастроентеро-панкреатичну та ендокринну системи.

Насьогодні виявлено велику кількість родовищ мінеральних вод, призначених для використання з бювету та промислового розливу. Втім, застосування нових лікувально-столових та лікувальних мінеральних вод можливе лише після всебічних доклінічних та клінічних випробувань для отримання максимально повної інформації про їх ефективність та особливості дії з метою розробки рекомендацій та інструкцій щодо їх застосування у медичній практиці.

Методичні рекомендації означеного напрямку в Україні не видавались. Запропоновані Методичні рекомендації дають можливість уніфікувати методичні підходи до доклінічних досліджень мінеральних лікувальних і лікувально-столових вод з метою отримання об'єктивно порівнюваних результатів досліджень, проведених у різних науково-дослідних лабораторіях та медичних центрах.

Ця розробка ґрунтується на методиках, регламентованих Паспортом Українського державного центру стандартизації та контролю якості природних і преформованих засобів Українського НДІ медичної реабілітації та курортології, акредитованого на технічну компетентність і незалежність у системі УкрСЕПРО Держстандарту України, та на методиках, затверджених Наказом МОЗ СРСР № 290 від 11.04.72 р. «Про уніфікацію клінічних і лабораторних засобів дослідження», Закону України «Про лікарські засоби», Закону України «Про якість та безпеку харчових продуктів і продовольчої сировини», а також General Screening Program.

## 1. Загальні положення

Мінеральними водами, що застосовуються з лікувальною метою, за визначенням В.В.Іванова та Г.О.Неврасва [14] називаються «природні води, які містять у підвищених концентраціях ті або інші мінеральні (рідше органічні) компоненти та гази, або яким притаманні будь-які фізичні властивості (радіоактивність, реакція середовища), і які справляють на організм людини лікувальну або профілактичну дію – на відміну від дії прісної води».

Цими ж авторами розроблена класифікація підземних мінеральних вод, яка до цього часу вважається загальноприйнятою у СНД. Згідно з цією класифікацією, основним критерієм специфічної дії лікувальних мінеральних вод є загальна мінералізація – не менше 1 г/дм<sup>3</sup>, а менш мінералізовані мінеральні води використовуються в медичній практиці при наявності в них специфічних компонентів у концентраціях, не нижчих за визначені величини (табл. 1):

Таблиця 1

*Мінімальна концентрація біологічно активних речовин і сполук лікувальних мінеральних вод*

Критерій	Значення масових концентрацій речовини, мг/дм <sup>3</sup> , не менше
Діоксид вуглецю вільний (розчинений)	0,5
Сірководень	10,0
Органічні речовини у перерахунку на вуглець валовий	5,0
Миш'як	0,7
Залізо, загальне	10,0
Бром	25,0
Йод	5,0
Метакремнієва кислота	50,0
Ортоборна кислота	35,0
Радон	185,0

## Оцінка специфічної фармакологічної активності лікарських засобів

У цій класифікації існує таке поняття, як мінеральна лікувально-столова вода, що застосовується як лікувальна згідно з призначенням лікаря курсовими дозами, або як столовий напій – не систематично. Промисловий розлив таких мінеральних вод регламентується стандартом України ДСТУ 878-93 «Води мінеральні питні. Технічні умови», згідно з яким «до мінеральних лікувально-столових вод відносяться води з мінералізацією від 1,0 до 8,0 г/дм<sup>3</sup> усіх хімічних груп і від 1,0 до 15 г/дм<sup>3</sup> груп: гідрокарбонатні натрієві, гідрокарбонатно-хлоридні, хлоридно-гідрокарбонатні натрієві чи при меншій мінералізації, які вміщують біологічно активні мікроелементи і сполуки в кількості, не нижчій від бальнеологічних норм, прийнятих для питних мінеральних вод» (табл. 2).

Таблиця 2

### Критерії оцінки мінеральних лікувально-столових вод

Назва мінеральної води	Критерії	Значення масових концентрацій речовини, мг/дм <sup>3</sup> , не менше
Залізна	Залізо (дво- і тривалентне)	10,0
Миш'яковиста	Миш'як	0,7–1,5
Борна	Ортоборна кислота	35,0
Бромна	Бром	25,0
Йодна	Йод	5,0
Кремнієва	Метакремнієва кислота	50,0
З вмістом органічних речовин	Органічні речовини (в розрахунок на вуглець)	5,0–30,0

У 1996 р. здійснено сиробу регламентації мінеральних вод, що застосовуються у лікувальній практиці санаторно-курортними закладами. З цією метою було опрацьовано галузевий стандарт Міністерства охорони здоров'я України ГСТУ 42.10–02–96 «Води мінеральні лікувальні. Технічні умови». Цей стандарт поширюється на природні підземні лікувальні води різних фізико-хімічних властивостей, які призначаються і вживаються у медичній реабілітації та курортології для внутрішнього та зовнішнього застосування. Дія цього стандарту не поширюється на води, що включені до ДСТУ 878–93, або які, згідно з ДСТУ 878–93, можуть бути класифіковані як лікувально-столові.

Згідно з ДСТУ 878–93 і ГСТУ 42.10–02–96, оцінка хімічного вмісту мінеральних вод, їхньої лікувальної дії та можливості їх медичного застосування обґрунтовується дослідженнями і заключеннями УкрНДІ медичної реабілітації та курортології. Рівень фізіологічної дії, специфічної активності та безпеки природних мінеральних вод встановлюється експериментально на лабораторних тваринах.

У медичній практиці природні лікувальні та лікувально-столові мінеральні води можуть бути віднесені до лікарських засобів малої інтенсивності, які збалансовано впливають на численні органи та системи організму людини. Через це при їх застосуванні не очікується локальних реакцій з відповідною клінічною симптоматикою. Дифузність впливу мінеральних вод визначає й те, що в їх біологічній дії відокремлюється пряма та опосередкована дія. Прямою дією є вплив специфічних компонентів мінеральних вод на шкіру, слизову ШКТ, функцію сечо- та жовчовиділення тощо. Під опосередкованою дією слід розуміти вплив специфічних компонентів мінеральної води на ЦНС та імунокомпетентні органи, які нормалізують діяльність всіх органів і систем організму. При вживанні мінеральних вод з лікувально-профілактичною метою необхідно враховувати добові дозування і засіб застосування мінеральних вод (напій, клізми, ванни), що змінює ефекти її використання. Вищенаведене дає можливість обґрунтувати принципи досліджень з метою оцінки біологічної дії мінеральних вод.

Оцінка біологічної дії мінеральної води можлива лише на підставі комплексних фізіологічних та біохімічних досліджень, а саме:

– пошук неспецифічних морфологічних змін в основних органах (печінка, нирки, серце, головний мозок, статеві залози, підшлункова залоза, ШКТ) з наступною диференціальною їх оцінкою;

- пошук неспецифічних фізіологічних змін (жовчо- та сечовиділення, ЕЕГ, ЕКГ, секретія шлунка) з наступною диференціацією результатів прямого і опосередкованого впливу;
- пошук неспецифічних біохімічних змін (загальний аналіз сечі, крові, продукти перекисного окислення ліпідів у сироватці крові), що сприяють оцінці прямої дії;
- оцінка динаміки виявлених змін;
- кількісне відображення спостережених змін;
- у зв'язку з опосередкованою дією мінеральних вод необхідне обстеження центрів, які регулюють вегетативні функції (гіпоталамус, таламус, підкоркові ядра).

## **2. Відбір, транспортування та зберігання мінеральних вод для доклінічних досліджень**

Природні мінеральні води – складні багатокомпонентні системи, які містять органічні та неорганічні речовини, у тому числі розчинені гази, останні перебувають у стані динамічної рівноваги. При виході води на поверхню відбувається зміна зовнішніх умов, порушується існуюча рівновага, що може призвести до зміни форм перебування речовин у воді, останні можуть випадати в осади. Зміна зовнішніх умов може викликати пригнічення одних або стимулювання життєдіяльності інших груп мікроорганізмів води, що викликає зміни її хімічного складу та властивостей.

Названі особливості води обумовлюють необхідність вибору оптимальної кількості необхідних для аналізу показників, що забезпечать вирішення поставлених завдань, і опрацювання правил відбору та транспортування, які дозволять отримати характеристики складу води максимально наближені до їх значень в зоні формування.

### **2.1. Підготовка водопунктів**

Якщо несамовиливні свердловини працюють періодично, необхідне попереднє прокачування їх, щоб наблизити склад води, що відкачується, до складу пластової. Тривалість прокачування становить не менше 2 діб. Проби води відбираються безпосередньо на гирлі свердловини до надходження її у накопичувальні ємкості або розвідну мережу.

### **2.2. Герметичний відбір**

Цей відбір вимагає спеціального устаткування. Звичайно застосовується гумовий шланг невеликого діаметру, один кінець якого змикається із спеціальним краном на напірному трубопроводі на гирлі свердловини (при відсутності крану – із штуцером, що ввертається в отвір з-під маңометру, або з патрубком на дозактовому фланці на лінії скиду), другий кінець шлангу опускається у отвір посуду для відбору проби. Після десятиразового обміну води у посуді для відбору шланг поступово усувається, посуд щільно закупорюється пробкою таким чином, щоб до нього не потрапляло повітря, принаймні його об'єм має бути мінімальним, не більше за  $0,5 \text{ см}^3$  на  $1 \text{ дм}^3$  води.

Посуд з водою для визначення органічних речовин щільно закривають пробками, обв'язують бинтом та обмащують розплавленим парафіном.

На гумові трубки барботерів для визначення радону накладаються затискувачі, барботери відразу ж перевертаються догори дном і у такому положенні транспортуються.

#### **2.2.1. Особливості відбору проб мінеральних вод для хімічного дослідження**

Основною вимогою при відборі проб води є забезпечення відповідності складу та властивостей відібраної води складу і властивостям її у водоносному горизонті, гирлі самовиливу тощо.

Невідповідність виникає у випадку аерації води при відкачуванні ерліфтом, при контакті відібраної води з повітрям, при тривалій взаємодії з матеріалами водопідйомного та водоприйомного обладнання (заглиблювальними насосами, обсадними трубами тощо).

При визначенні розчинених форм речовин вода, що відбирається для аналізу, спочатку фільтрується через паперові або мембранні фільтри. Для відділення емульгованих сполук застосовуються фільтри «біла стрічка» з діаметром пор 3,5 мкм. При наявності у воді грубодисперсної зависі фільтрація ведеться через паперові фільтри «синя стрічка» з діаметром пор 1–2,5 мкм. Тонкодисперсні зависі відділяються фільтрацією води через мембранні фільтри з діаметром пор 0,5 мкм.

При відборі води для аналізу на вміст перемінновалентних елементів для фільтрації доцільно використовувати спеціальну герметичну воронку, яка забезпечує ізоляцію води від повітря.

Кількість води, що відбирається у водопунктах, залежить від мети аналізу, яка визначається певними завданнями, та від мінералізації води.

Для виконання стислого аналізу (макрокомпонентний склад, санітарно-хімічні компоненти) необхідні такі об'єми відібраної води:

з мінералізацією до 5 г/дм <sup>3</sup>	– 2,5 дм <sup>3</sup> ;
10–35 г/дм <sup>3</sup>	– 1,0 дм <sup>3</sup> ;
понад 35 г/ дм <sup>3</sup>	– 0,5 дм <sup>3</sup> .

Для виконання повного хімічного аналізу без визначення органічного і газового складу (макро- і мікрокомпонентний склад, санітарно-хімічні компоненти, токсичні речовини, біологічно активні елементи) необхідні об'єми води:

з мінералізацією до 5 г/дм <sup>3</sup>	– 5 дм <sup>3</sup> ;
5–10 г/дм <sup>3</sup>	– 4 дм <sup>3</sup> ;
10–35 г/дм <sup>3</sup>	– 3 дм <sup>3</sup> ;
понад 35 г/ дм <sup>3</sup>	– 2 дм <sup>3</sup> .

При виконанні хімічних аналізів з визначенням органічних речовин поряд з зазначеними вище, можливі три варіанти:

а) стислий аналіз з визначенням валового органічного вуглецю (узагальненого показника вмісту органічних речовин);

б) повний хімічний аналіз з визначенням валового органічного вуглецю;

в) повний хімічний аналіз з визначенням валового органічного вуглецю та компонентного складу органічних речовин.

Потрібні для повного аналізу об'єми води відповідно збільшуються на:

а) 0,6 л; б) 0,6 л; в) 5,0 л спеціального відбору.

### 2.2.2. Особливості відбору проб мінеральних вод для мікробіологічного аналізу

Відбір проб мінеральних вод для мікробіологічного аналізу здійснюється спеціально проінструкованою особою. Для відбору проб мінеральних вод та подальшого аналізу завчасно готують стерильний мікробіологічний посуд, поживні середовища та реактиви.

Відбір проб з джерел здійснюється на місці їхнього виходу із землі після попереднього облаштування ґрунту на площині радіусом 20–30 см навкруги гирла.

Для санітарно-бактеріологічного аналізу проби відбирають у стерильні скляні пляшки об'ємом 0,5 л.

При дослідженні на патогенну мікрофлору об'єм води для одного аналізу збільшується до 1–3 л.

Відбір води для виявлення автохтонної мікрофлори здійснюють також з дотриманням всіх наведених правил стерильності, але у флакони меншої ємкості: 100–200 мл. При закупорюванні заповненого флакону пробка має витиснути надлишок води.

### *2.2.3. Особливості відбору проб мінеральних вод для визначення їх біологічної активності, біохімічних та гістологічних досліджень*

Перший початковий етап роботи здійснюється біля джерела або біля свердловини. Це й визначає специфіку відбору мінеральної води. Проба відбирається у чистий посуд (десятиразове ополоскування водопровідною водою і триразове ополоскування дистильованою) у кількості, відповідній до об'єму води, що вводиться всім експериментальним тваринам на день досліду. Для цього індивідуальне дозування кожній тварині помножується на кількість тварин в експерименті. Досліджувана вода наливається, після ополоскування нею ж, у ємкість так, щоб не залишався повітряний міхурець. Пробка занурюється у воду, витискуючи повітря. Залишки води у наступну добу після відкриття флакону не застосовуються.

### **2.3. Документація відібраних проб**

Документація відбору є обов'язковою процедурою. Кожний зразок супроводжується актом відбору проб, у якому мають наводитись відомості про замовника, адреса та геологічна прив'язка водопункту, дата, умови та методика відбору, ціль аналізу.

Акт повинен бути завірений підписами та відомостями про посаду особи, яка відібрала пробу у присутності відповідального за експлуатацію свердловини або джерела, та представника санепідслужби. Акт відбору проб має бути засвідчений печаткою.

## **3. Фізико-хімічні дослідження мінеральних вод**

Фізико-хімічні дослідження, проведені з метою визначення хімічного складу вод, виявлення присутніх у них специфічних біологічно активних компонентів – обов'язковий, невід'ємний етап доклінічного дослідження мінеральних вод. На цьому етапі проводиться комплексне вивчення фізико-хімічних показників мінеральних вод, яке включає польові і стаціонарні лабораторні дослідження.

### **3.1. Польові дослідження**

У польових умовах, безпосередньо на місці водозабору (біля джерела, свердловини мінеральної води) визначають склад компонентів, які можуть змінитися при зберіганні і транспортуванні. До числа таких показників належать:

- органолептичні показники води (запах, смак, колір, прозорість);
- температура води;
- показник кислотно-лужних властивостей – рН;
- показник окислювально-відновних властивостей – Eh;
- масова концентрація гідрокарбонат- та карбонат-іонів;
- масова концентрація заліза;
- санітарно-хімічні показники якості води (вміст нітрат-, нітрит-іонів, іонів амонію);
- перманганатна окислювальність.

### **3.2. Стаціонарні лабораторні дослідження мінеральних вод**

У лабораторних умовах проводиться всебічне вивчення макро- та мікрокомпонентного складу мінеральних вод, визначення біологічно активних і нормованих компонентів, згідно з вимогами ДСТУ 878–93 і ГСТУ 42.10–02–96.

Повний перелік фізико-хімічних показників мінеральних вод містить:

- значення рН і Eh води;

## Оцінка специфічної фармакологічної активності лікарських засобів

- основний іонний склад води (масова концентрація хлорид-, карбонат-, гідрокарбонат-сульфат-іонів; іонів натрію і калію, кальцію, магнію);
- мінералізацію (загальний солевміст – сума всіх розчинених у воді речовин, окрім газів, у г/дм<sup>3</sup>);
- санітарно-хімічні показники (масова концентрація нітрит-, нітрат-іонів, іонів амонію);
- склад компонентів:
  - біологічно активні речовини (двоокис вуглецю, сірководень, бор, кремній, йод, бром, залізо, миш'як, радон);
  - нормовані речовини (масова концентрація свинцю, селену, кадмію, міді, цинку, ванадію, ртуті, хрому, миш'яку, урану, радію);
  - склад органічних речовин (концентрація валового органічного вуглецю) та (або) перманганатна окислювальність.

При дослідженні слабомінералізованих вод з підвищеним вмістом органічних речовин (попад 5 мг/дм<sup>3</sup> валового органічного вуглецю), окрім визначення  $C_{орг}$ , доцільно вивчити компонентний склад органічних речовин. У водах цього типу визначають такі показники як органічний азот, концентрація карбонових, гумінових кислот, фульвокислот, склад бітумів (нейтральних та кислих), значення буферної ємкості. Методики аналізу мінеральних вод наведені у відповідній науково-технічній документації та літературних джерелах.

Дані про методи дослідження фізико-хімічних характеристик мінеральних вод та зазначення відповідних нормативних документів узагальнені в таблиці 3.

Таблиця 3

### Методи фізико-хімічних досліджень мінеральних вод

Назва методу	Нормативний документ
Відбір проб	ГОСТ 23268.0, СТ СЭВ 4285-84
Визначення температури	А.А.Резников, Е.П.Муликовская, И.Ю.Соколов. Методы анализа природных вод.- М.: Недра, 1970.
Визначення органолептичних показників	ГОСТ 23268.1-91, ГОСТ 3351-74
Визначення двоокису вуглецю	ГОСТ 23268.2-91, ГСТУ 18.18-97
Визначення гідрокарбонат-іонів	ГОСТ 23268.3-78, ГОСТ 26449.1-85
Визначення іонів магнію і кальцію	ГОСТ 23268.5-78, ГОСТ 26449.1-85
Визначення іонів натрію	ГОСТ 23268.6-78
Визначення іонів калію	ГОСТ 23268.7-78
Визначення нітрит-іонів	ГОСТ 23268.8-78, ГОСТ 4192-82
Визначення нітрат-іонів	ГОСТ 23268.9-78, ГОСТ 18826-73, А.А.Резников, Е.П.Муликовская, И.Ю.Соколов. Методы анализа природных вод.- М.: Госгеолтехиздат, 1963.
Визначення іонів амонію	ГОСТ 23268.10-78, ГОСТ 26449.1-85, ГОСТ 4192-82
Визначення заліза	ГОСТ 4011-72, ГОСТ 23268.11-78, 30178-96
Визначення перманганатної окисності	ГОСТ 23268.12-78
Визначення хлорид-іонів	ГОСТ 23268.17-78, ГОСТ 26449.1-85, ГОСТ 4245-72
Визначення фторид-іонів	ГОСТ 23268.18-78
Визначення метакремнієвої кислоти	ГОСТ 26449.1-85, А.А.Резников, Е.П.Муликовская, И.Ю.Соколов. Методы анализа природных вод.- М.: Недра, 1970.
Визначення фенолів	ГОСТ 26449.1-85
Визначення рН	ГОСТ 26449.1-85
Визначення сухого залишку	ГОСТ 26449.1-85, ГОСТ 18164-72
Визначення карбонат-іонів	ГОСТ 26449.1-85
Визначення сульфат-іонів	ГОСТ 26449.1-85, ГОСТ 4389-72, ГОСТ 23268.7-78
Визначення кисню	ГОСТ 26449.3-85



Назва методу	Нормативний документ
Визначення сірководню	ГОСТ 26449.3-85, А.А.Резников, Е.П.Муликовская, И.Ю.Соколов. Методы анализа природных вод.- М.: Недра, 1970.
Визначення ртуті	ГОСТ 26927-86, Паспорт прибора анализатора ртути «Юлия 2К»
Визначення міді	ГОСТ 26449.1-95, ГОСТ 26931-86, ГОСТ 4388-72, РД 52.24.377-95, ГОСТ 30 178-96
Визначення хрому	ГОСТ 26449.1-95, РД 52.24.377-95
Визначення свинцю	ГОСТ 18293-72, ГОСТ 30178-96, РД 52.24.377-95
Визначення кадмію	ГОСТ 30178-96, РД 52.24.377-95
Визначення селену	ГОСТ 19413-89
Визначення стронцію	ГОСТ 23950-88
Визначення ванадію	РД 52.24.377-95
Визначення миш'яку	ГОСТ 26930-86
Визначення срібла	ГОСТ 23268.13-78, ГОСТ 18293-72, РД 52.24.377-95
Визначення цинку	ГОСТ 30 178-96, ГОСТ 18293-72, ГОСТ 26934-86, РД 52.24.377-95
Визначення азоту	Ю.Ю.Лурье. Унифицированные методы анализа вод.- М.: Химия, 1973.
Визначення Eh	Паспорт прибора универсального иономера ЭВ-74. П.9.2. Измерение окислительно-восстановительного потенциала.
Визначення урану	Унифицированные методы исследования качества вод. Ч.II. Методы радиохимического анализа вод. Сов. СЗВ.- М., 1983. А.А.Резников, Е.П.Муликовская, И.Ю.Соколов. Методы анализа природных вод.- М.: Недра, 1970.
Визначення радію, радону	Е.Л.Железнова, И.П.Шумилина, Б.Я.Юфа. Радиометрические методы естественных радиоактивных элементов. Практическое руководство.- М.: Недра, 1968. А.А.Резников, Е.П.Муликовская, И.Ю.Соколов. Методы анализа природных вод.- М.: Недра, 1970.
Визначення суми іонів натрію і калію, мінералізації розрахунковим способом	А.А.Резников, Е.П.Муликовская, И.Ю.Соколов. Методы анализа природных вод.- М.: Недра, 1970.
Визначення ортоборної кислоти	А.А.Резников, Е.П.Муликовская, И.Ю.Соколов. Методы анализа природных вод.- М.: Недра, 1970.
Визначення бромід-іонів	У.Дж.Уильямс. Определение анионов.- М.: Химия, 1982. Д.Мидгли. Потенциометрический анализ воды.- М.: Мир, 1980.
Визначення іодид-іонів	Д.Мидгли. Потенциометрический анализ воды.- М.: Мир, 1980.
Визначення валового вмісту органічних речовин (Сорг.)	ИСО 8245-87, О.А.Алекин и др. Руководство по химическому анализу вод суши.- Л.: Гидрометиздат, 1973. Метод определения органического углерода в природных водах. Бикбулатов Е.С. Проблемы аналитической химии.- М.: Наука, 1977.- С. 171-176.
Визначення бітумів нейтральних	Методы анализа органических веществ подземных минеральных вод/Методические указания, 1969.
Визначення бітумів кислих	Методы анализа органических веществ подземных минеральных вод/Методические указания, 1969.
Визначення спирторозчинних речовин	Методы анализа органических веществ подземных минеральных вод/Методические указания, 1969.
Визначення гумінових кислот	Методы анализа органических веществ подземных минеральных вод/Методические указания, 1969.
Визначення фульвокислот	Методы анализа органических веществ подземных минеральных вод/Методические указания, 1969.
Визначення карбонових кислот	В.И.Бахман. Методика анализа минеральных вод.- М., 1965.
Визначення пестицидів	Методы определения микроколичеств пестицидов в продуктах питания, кормах и внешней среде. Справочник. Т.1, 2.- М.: Колос, 1992.
Визначення нафтопродуктів	Ю.В.Новиков, К.О.Ласточкина, З.Н.Болдина. Методы исследования качества воды водоемов.- М.: Медицина, 1990.

На підставі отриманих результатів фізико-хімічних досліджень мінеральних вод згідно з класифікацією В.В.Іванова, Г.О.Невраєва, за хімічним (іонним та газовим) складом, фізичними властивостями і бальнеологічним значенням досліджувані мінеральні води можна віднести до однієї з восьми основних бальнеологічних груп:

- I – без специфічних компонентів та властивостей;
- II – вуглекислі;
- III – сульфідні;
- IV – залістисті, миш'яковисті та «поліметалічні» з підвищеним вмістом декількох металів – Mn, Cu, Pb, Zn, Al тощо;
- V – бромні, йодно-бромні, йодні;
- VI – кремністі термальні;
- VII – радонові;
- VIII – слабомінералізовані з підвищеним вмістом органічних речовин.

Це дозволить визначити напрямок подальших фізико-хімічних досліджень з урахуванням специфіки мінеральних вод за умов забезпечення необхідної інформативності для подальшого проведення доклінічного дослідження з метою встановлення їх специфічної активності та безпеки.

### **4. Мікробіологічні дослідження мінеральних вод**

У підземних водах, особливо інфільтрогенного походження, визначаються майже всі представники таксономічних і еколого-трофічних груп мікроорганізмів, що зустрічаються у ґрунті. Втім, мінеральним водам властива певна специфічність мікробних ценозів, яка істотно відрізняє їх від мікроорганізмів, що надходять ззовні. Тому всі водні мікроорганізми поділяються на аутохтонні, адаптовані до екологічних умов родовища мінеральних вод та алохтонні, які являються показниками забруднення мінеральних вод.

Залежно від типів обміну та застосування джерел енергії мікроорганізми поділяють на окремі групи. З гігієнічної точки зору найбільше значення має алохтонна група мікроорганізмів, яка може представляти потенційну епідемічну небезпеку через можливе надходження патогенних мікроорганізмів. Аутохтонні мікроорганізми відіграють певну роль у перетворенні хімічних компонентів води, у т.ч. мінералізації органічних речовин.

Завдяки спроможності утворювати антибіотичні речовини, вони забезпечують воді таку важливу для терапії властивість, як бактерицидність.

Активність і поширеність мікроорганізмів різних груп залежать від екологічних умов, типів води, від ступеня трофіки водного джерела.

Визначення кількості окремих груп мікроорганізмів дозволяє судити про генезис мінеральних вод, їхню здатність до самоочищення від алохтонних мікроорганізмів, бактерицидну дію, а також дає уявлення про тенденції розвитку мікроорганізмів, які населяють воду, діяльність яких може впливати на фізико-хімічні і органолептичні показники.

#### **4.1. Перелік методик**

Зважаючи на наведене, пропонується досліджувати мінеральні води, застосовуючи методи, що наведені у таблиці 4.

#### **4.2 Оцінка методик**

При відповідності мінеральних вод санітарно-бактеріологічним вимогам до питних мінеральних вод (загальне мікробне число не більше 100 колонієутворюючих одиниць в 1 см<sup>3</sup>, коли-індекс < 3, відсутність синьогнійної палички), їхній стан оцінюється як задовільний. У ра-

## Методи мікробіологічних досліджень мінеральних вод

Назва методу	Нормативний документ
Визначення аутохтонної мікрофлори мінеральних вод: Гетеротрофні бактерії	Методические рекомендации по микробиологическому исследованию лечебных минеральных вод. Максимович К.А., Николенко С.И. В надзаг: МЗ УССР, ОНИИК, г.Одесса, 1984, с. 22.
Амілолітичні бактерії	- -/- -
Целюлозорозкладаючі бактерії	- -/- -
Маслянокислі бактерії	- -/- -
Жиророзщеплюючі бактерії	- -/- -
Метанутворюючі бактерії	- -/- -
Вуглеводеньокислюючі бактерії	- -/- -
Амоніфікуючі бактерії	- -/- -
Денітрифікуючі бактерії	- -/- -
Сульфатредуючі бактерії	- -/- -
Тіонові бактерії	Романенко В.И., Кузнецов С.И. Экология микроорганизмов пресных водоемов.– Л.: Наука, 1974.– 193 с.
Гетеротрофні залізобактерії	- -/- -
Олігокарбофіли	- -/- -
Стрептоміцети	Унифицированные методы исследования качества вод. Ч.IV. Микробиологические методы.– М., 1985.– С. 57–59.
Актиноміцети	Унифицированные методы исследования качества вод. Ч.IV. Микробиологические методы.– М., 1985.– С. 56 – 57.
Спороутворюючі бактерії	А.Г.Родина. Методы водной микробиологии. Практ. руководство.– М.: Наука, 1965.– 364 с.
Залізоокислюючі бактерії	Svorcova L. Kultivacni media pro snanoveni zelezistych, manganovych a sirnych bacterii//Biologia (CSSR).– 1983.– V.38, №7.– S. 696–706.
Марганецьокислюючі бактерії	- -/- -
Бактерії-продуценти амінокислот	Методика оценки способности аутохтонной микрофлоры продуцировать аминокислоты в минеральных водах. Инф.письмо.– К., 1984.– С. 1–3. В надзаг: МЗ УССР. Респ. центр НМИ ОНИИК.
Міксобактерії	Lecianova L. Muxobacterie ve vodach//Prace a studie (CSSR).– 1987.– V.170.– S. 1–128.
Мікроскопічні гриби	А.В.Вершигора, Л.В.Григорьева, В.А.Ярошенко. Санитарная микробиология.– К., 1976.– 199 с.
Визначення здатності сульфатредуючих бактерій продукувати сірководень	В.И.Бахман. Методика анализа минеральных вод.– М., 1965.
Визначення впливу токсичних речовин на мікрофлору	Lui D. et al. Rapid toxicity assesment of water-soluble and water-insoluble chemicals using a modifidied agar plate method//Water Res.– 1989.– V.23.– P. 333– 339.
Визначення індексу бактерицидності мінеральних вод	Способ определения индекса бактерицидности минеральных вод. С.И.Николенко. Рацпредложение 6/91.
Визначення санітарно-бактеріологічних показників:	ГОСТ 18963-73
Загальне мікробне число	ГОСТ 18963-73
Кількість бактерій групи кишкових паличок (колі-індекс)	- -/- -
Бактерії – показники свіжого фекального забруднення	- -/- -
Синьогнійна паличка (Pseudomonas aeruginosa)	Методичні рекомендації по вивченню синьогнійної палички (Pseudomonas aeruginosa) в питних мінеральних водах.– Одеса, 1996.–16 с.
Методика санітарно-бактеріологічного дослідження ропи, ґрунтових вод, розсолів	Информационно-методические материалы по вопросам гидрогеологии и бальнеотехники лечебных вод и грязей.– М., 1960.– В.II.– С. 53–54.

## Оцінка специфічної фармакологічної активності лікарських засобів

зі погіршення основних нормативних показників мінеральні води передаються до санітарно-епідеміологічних станцій для визначення в них патогенних ентеробактерій.

Серед аутохтонної мікрофлори мінеральних вод при належній експлуатації джерел мінеральних вод немає жодного збудника хвороб. Але ця мікрофлора здатна викликати біохімічні процеси у мінеральних водах не лише в природних умовах, а й у водах, які розлиті по пляшках (табл. 5).

Таблиця 5

*Аутохтонні мікроорганізми мінеральних вод та їх значення*

Назва мікроорганізмів	Можливий вплив на якість води
Олігокарбофільні бактерії	Мають ефективну систему засвоювання субстрату і майже завжди переважають алохтонні мікроорганізми у конкуренції за харчові речовини. У чистих, незабруднених водах кількісно домінують над гетеротрофними бактеріями.
Гетеротрофні бактерії	Посилюють процеси мобілізації хімічних елементів з пород та активізують їхню міграцію у водному середовищі під впливом продуктів життєдіяльності. Засвоюють речовини органічного походження, сприяють самоочищенню води.
Спороутворюючі бактерії	Відновлюють нітрати, антагоністи індикаторних видів, потенціал корозії. Підвищена кількість спороутворюючих мікроорганізмів вказує на наявність у воді органічних речовин, які погано окислюються, та на умови, при яких неспороутворюючі мікроби або вегетативні форми спороутворюючих були пригнічені (токсичні речовини).
Амілолітичні	Продукти амілази, сприяють розкладанню крохмалистих речовин. Амілолітичні бактерії з продуцентами амілази – ферменту, недостатня кількість якого спостерігається при шлункових хворобах. Сприяють збагаченню вод цим ферментом.
Маслянокислі	Розщеплюють вуглеводи та спирти і їхні сполуки з утворенням масляної кислоти і ряду сторонніх продуктів: кислот жирного ряду, спирту, ацетону, водню і CO <sub>2</sub> .
Жиророзщеплюючі	Розкладають жири з утворенням жирних кислот і CO <sub>2</sub> .
Метаноутворюючі	Викликають бродіння солей органічних кислот, сприяють утворенню метану, CO <sub>2</sub> .
Вуглеводеньокислюючі	Окислюють вуглеводи з утворенням різного типу органічних кислот, спиртів, альдегідів, вітамінів B <sub>2</sub> , B <sub>12</sub> .
Амоніфікуючі	Розщеплюють білки і протеїни з утворенням амінів, амідів, амінокислот, сірководню, аміаку, індолу та ін. Продукти протеаз.
Денітрифікуючі	Обумовлюють процеси міграції азоту у підземних водах. Засвоюють вуглеводи, смоли, бітуми, спирти, органічні кислоти, продукти розпаду білків. Сприяють вивільненню водної маси від нітритів і нітратів
Целюлозорозчинні аероби	Наявність або відсутність цих мікроорганізмів може засвідчувати про ступінь впливу поверхневих інфільтрованих з поверхні вод на водоносний горизонт.
Залізоокислюючі	Створюють потенціал корозії, сприяють утворенню гідрату окису заліза у залізовміщуючих водах, погіршують органолептичні показники води.
Марганецьокислюючі	Сприяють окисленню двовалентного марганцю до чотиривалентного.
Сульфатредуючі	Активно впливають на окислювально-відновний потенціал середовища завдяки утворенню сірководню.
Тіонові	Окислюють сірководень, сприяючи утворенню сульфатів, необхідних при лікуванні захворювань гепатобіліарної системи.
Гетеротрофні бактерії – продуценти амінокислот	Сприяють накопиченню у водах амінокислот, які використовуються у біосинтезі поліпептидів і білків, а також у синтезі фосфатидів, порфіринів і нуклеотидів.
Міксобактерії	Показники забруднення водоносного горизонту органічними відходами сільськогосподарського походження.
Актиноміцети роду стрептоміцетів	Активно мінералізують органічні речовини, в т.ч. такі стійкі, як клітковина і лігнін. Беруть участь у розщепленні білків та вуглеводів до утворення органічних кислот, внаслідок чого підвищується кислотність, посилюється розпад мінералів, виникають органоінеральні комплекси. Є продуцентами запахоутворюючих речовин у водному середовищі, негативно впливають на органолептичні показники.
Мікроскопічні гриби	Беруть участь у розкладі органічних речовин, які надходять у воду, за умов, несприятливих для бактерій.

Завдяки ряду факторів, а також присутності мікробів-антагоністів, мінеральним водам притаманна бактерицидна дія, інтенсивність якої варіює залежно від родовищ і типів вод.

Визначення бактерицидності проводять за допомогою тест-культури кишкової палички (штам 846), вносячи її у зразки досліджуваної води. За тривалістю виживання тест-культури роблять висновок про інтенсивність антимікробної дії.

## 5. Фізіологічні та біохімічні дослідження

### 5.1. Навантаження тварин досліджуваною мінеральною водою

Для виявлення біологічної активності води в експерименті використовуються білі щури (лінійні і нелінійні). Оптимальними вважаються тварини з масою тіла 180–200 г незалежно від статі. Під час експерименту тварини мають знаходитись у звичайних умовах віварію, харчовий і питний режими підтримуються постійними, на повсякденному рівні. Досліджувану воду вводять додатково зондом (зонд діаметром 1 мм) безпосередньо у шлунок. Добова доза досліджуваної води обов'язково становить 1% маси тіла тварини і розраховується індивідуально. Водне навантаження проводиться 1 раз на добу, у вечірній час (приблизно о 17<sup>00</sup>). Відбір біологічного матеріалу здійснюється через 16–18 год після введення води. Для оцінки біологічної дії води проводять одноденне навантаження. При обґрунтуванні медичних показань для клінічної апробації проводять курсове навантаження 12 щоденними введеннями.

### 5.2. Відбір біологічного матеріалу

#### Жовч

Для збирання жовчі проводять операцію мікроканюлювання жовчної протоки щура, оскільки у цих тварин жовчний міхур відсутній. Проводять наркотизацію тварини гексеналом або тіопенталом в дозі 100 мг/кг, який вводять внутрішньоочеревинно з розрахунку 0,1 мл/100 г маси тіла. Пошарово розкривають черевну порожнину, під жовчну протоку підводять лігатуру з міцної нитки. Надрізують (або наколюють) стінку протоки і вставляють поліетиленову канюлю діаметром 1–3 мм, фіксуючи лігатурою. Потім інший кінець канюлі з'єднують з мікропіпеткою і ресструють холерез, виражаючи його в кількості мкл на 100 г маси за певний відрізок часу (0,5 год, 1 год або 3 год). За необхідності можна фіксувати динаміку холерезу.

#### Сеча

Для збирання сечі щура розташовують у спеціальній індивідуальній клітці, яка має у кінці конічному дні металеву або пластмасову сітку з отворами діаметром приблизно 2 мм. Для отримання більш чистої сечі необхідно користуватися скляним відділювачем. Тварини розташовують у клітці одразу після дозованого введення досліджуваної води і витримують добу без їжі та води. Кількість сечі вимірюється у мл і для уніфікації проводиться розрахунок її на одиницю поверхні тіла (мл/см<sup>2</sup> за добу).

#### Кров

Отримання сироватки

Тварину після проведення експерименту декапітують і кров збирають у суху центрифужну пробірку (об'ємом не менше ніж на 10 см<sup>3</sup>). Кров відстоюють до зсідання і потім центрифугують 20 хв при 1500 об./хв для отримання сироватки.

#### Тканини

А) Біохімічні дослідження. Після декапітації тваринам швидко розтинають черевну порожнину, вилучають печінку та промивають її холодним 0,25 М розчином цукрози (рН 7,4). Гомо-

генат готують на 0,25 М розчині цукрози в концентрації 28%. Для отримання мікросом отриманий гомогенат центрифугують при 10000 g 20 хв. До надосадової рідини (НОР) додають 0,08 мл 1 М розчину  $\text{CaCl}_2$  і центрифугують впродовж 10 хв. НОР зливають, а осад знову суспендують впродовж 10 хв (у 0,25 М розчині цукрози) та розчиняють цукрозою з розрахунку: до мікросом, отриманих з 1 г печінки, додають 1 мл 0,25 М розчину цукрози. Вся процедура виділення мікросом проводиться в інтервалі температур від 0 до 10°C.

Б) Визначення загальної кількості води тканин. Взятий шматочок тканини водних депо організму (шкіра, печінка, нирки) промокають фільтрувальним папірцем, зважують дуже точно (на торсійних вагах), а потім наважку тканини розміщують у сушильній шафі при температурі 105°C, де висушують її до постійної ваги (48–72 год). Різниця між початковою вагою і вагою після висушування і складає вміст води у цій наважці тканини.

В) Визначення електролітів у тканинах. Для екстракції електролітів з тканин спочатку їхні шматочки точно зважують на торсійних вагах. Наважку тканини переносять у хімічно чисту суху пробірку, куди приливають 0,5 мл хімічно чистої концентрованої азотної кислоти і нагрівають до повного розчинення тканини. Потім додають 2 мл дистильованої води і центрифугують. Надосадову рідину доводять до 20 мл водою. Проба готова для фотометрії.

Г) Морфологічні дослідження. Для отримання точних даних щодо структурно-функціональних змін в органах і системах потрібно при вилученні матеріалу дотримуватись наступних умов.

1. Максимально бережливий спосіб забору матеріалів, мінімальні терміни після виведення тварини з досліду.

2. Максимально бережливий спосіб фіксації матеріалу (забуферений формалін, рідина Карнуа або використання нативного матеріалу).

3. У випадках запланованого ультраструктурного дослідження доцільно для фіксації всього вилученого спільного гістологічного та ультраструктурного матеріалу використовувати фіксатор на основі глутаральдегіду такого складу:

- глутаральдегід 2,25% – 100,0 мл;
- параформ 4% – 500,0;
- 0,2 М фосфатний буфер рН 7,2 – 400,0.

4. Для світлооптичних досліджень доцільне вилучення симетричних шматочків досліджуваного органу: один – на гістологічне, інший – на гістохімічне дослідження. Для проведення гістохімічних досліджень на один блок належить монтувати дослідний і контрольний матеріал та розташовувати їх на одному склі. Як заморожуючий агент краще всього застосовувати рідкий азот (-196°C), хоча допустимо використовувати суху вуглекислоту (-70°C) або хлоретил (-60°C).

### **5.3. Перелік і оцінка методик для виявлення біологічної активності мінеральних вод**

#### **Оцінка периферичної крові:**

- 1) кількість еритроцитів в периферичній крові (загально прийнятий метод);
- 2) концентрація гемоглобіну в крові (фотоелектроколориметрично);
- 3) кольоровий показник крові;
- 4) лейкоцитарна формула;
- 5) вміст заліза у сироватці крові (за допомогою приладу Біо-ла-тест, інші біохімічні методи).

При водних навантаженнях у тварин важливою є стабільність показників кількості еритроцитів, гемоглобіну і кольорового показника, що свідчить про нешкідливість дії досліджуваної води на організм. Коливання складу заліза у сироватці мають значення при моделюванні залізодефіцитних анемії та корекції її внутрішнім прийомом залізистих мінеральних вод.

**Оцінка функціонального стану печінки:**

- 1) визначення сумарних жовчних кислот та холатів (СЖК+Х) у жовчі [22];
- 2) визначення холестерину жовчі [30];
- 3) розрахунок літогенного індекса жовчі (СЖК+Х)/холестерин;
- 4) розрахунок індексу насичення жовчі холестерином (ІНХ) з рівня базального холерезу і концентрації холестерину;
- 5) визначення вмісту білірубіну у крові [23];
- 6) визначення АсАТ, АлАТ.

Оцінюючи функціональний стан печінки, слід насамперед звернути увагу на наявність жовчогінного ефекту після введення мінеральної води. Для уніфікації цього показника є обов'язковим визначення відношення кількості виділеної жовчі до маси тіла тварини (мл/100 г маси). Оцінюючи функціональний стан печінки, слід насамперед звернути увагу на наявність жовчогінного ефекту після введення мінеральної води, а також обов'язкове дотримання відрізка часу не менше ніж 18–20 год після водного навантаження, у який тварини мають бути без їжі і води. Окрім жовчогінного ефекту, навіть без його наявності, мінеральні води стимулюють жовчоутворення.

Потрібно враховувати співвідношення сумарних жовчних кислот та холатів до холестерину жовчі. Це співвідношення характеризує літогенність жовчі і ступінь насичення її холестерином. Підвищення рівня білірубіну та холестерину у жовчі та крові свідчить про функціональні порушення печінки.

**Оцінка функціонального стану нирок:**

- 1) рівень добового діурезу;
- 2) механізм сечоутворення щодо парціальних функцій нефрону:
  - визначення швидкості фільтрації первинної сечі;
  - відсоток зворотнього всмоктування води, розрахований за креатиніновим кліренсом [16];
- 3) очищувальна функція нирок оцінюється за величиною добового виведення азотистих і солевих шлаків:
  - визначення сечовини в сечі (набори реактивів «Біотест-Лахема», уреазний метод [16] і метод Рашкована в модифікації С.Г.Гасанова [13]);
  - визначення сечовини в крові (набори реактивів «Біотест-Лахема», уреазний метод [16] і метод Рашкована в модифікації С.Г.Гасанова [13]);
  - визначення хлоридів у сечі (метод Мора) [15].

Функціональний стан нирок оцінюється передусім за рівнем добового діурезу після навантаження тварин мінеральною водою. Для з'ясування спроможності нирок розвивати діурез безпосередньо після введення води, вивчається динаміка «водного» діурезу (1,5–2,0 год). На вираженість «водного» діурезу впливає спосіб введення води, що вивчається. В цьому випадку дуже важливе вмiле і безболісне зондування, тобто експериментатор повинен мати певні навички. Для підтвердження діуретичної дії вод на етапі доклінічних досліджень слід проводити додаткове водне навантаження (1 % від маси тіла тварини). Мінеральна вода вводиться зондом у шлунок тварини. Безпосередньо після водного навантаження тварин розміщують у обмінних клітках, які призначені для збору сечі і витримують протягом 24 год. Отримані величини повинні бути віднесені до одиниці поверхні тіла.

Істотним моментом в оцінці впливу мінеральної води на сечовиділення є з'ясування питання, за рахунок якої функції нефрону відбувається приріст обсягу виділеної сечі – збільшення швидкості фільтрації первинної сечі у ниркових клубочках чи зменшення відсотку реабсорбованої води у ниркових канальцях, що визначається за креатиніновим кліренсом.

Визначення кількості сечовини та хлоридів дасть можливість оцінити очищувальну функцію нирок і безпечність застосування мінеральної води.

**Оцінка функціонального стану шлунка**

Протекторна дія води виявляється при моделюванні іммобілізаційно-холодової виразки шлунка [27]. Для цього тварин після добового голодування розташовують у металевих патро-

нах з отворами та вміщують у рефрижератор при температурі 2–4°C на 5 год. Далі проводять евтаназію тварин та розглядають розтинений по великій кривизні шлунок під лупою. Ступінь стресових уражень слизової оболонки шлунку оцінюють за 4-бальною шкалою.

Попереднє проведення курсу водних навантажень при моделюванні виразки шлунка повинно істотно знижувати інтенсивність виразкоутворювання, кількість ерозій і гіперемій слизової шлунка.

### Оцінка функціонального стану підшлункової залози

Здійснюється за допомогою визначення активності  $\alpha$ -амілази сироватки крові [36]. Про функціональний стан підшлункової залози свідчить певний рівень активності  $\alpha$ -амілази, підвищення якого вказує на її патологічний стан.

Всі наведені методики затверджені Наказом МОЗ СРСР № 290 від 11.04.72 «Про уніфікацію клінічних і лабораторних засобів дослідження».

### Оцінка функціонального стану центральної нервової системи

#### *Вивчення впливу на центральну нервову систему в тесті «відкрите поле»*

Тест «відкрите поле» дозволяє виявити тип дії досліджуваної сполуки на ЦНС: збуджуючий чи гальмівний, а також з'ясувати вплив на емоції і орієнтовно-дослідницьку діяльність тварин.

Тест «відкрите поле», як правило, представляє собою квадратну камеру (100x100 см) з дерев'яними або пластиковими стінками (25–40 см) та підлогою, що розділена фарбою на 25–49 квадратів. В центрі певної кількості квадратів (наприклад, 36 із 49) у довільному порядку в підлозі зроблені отвори («нірки»).

Тварину висаджують в центральний квадрат і фіксують латентний період виходу з нього. Критерієм переходу щура до іншого квадрату вважають переміщення через лінію, що розділяє квадрати, обох задніх кінцівок. Враховують також кількість квадратів, в які зайшла тварина (горизонтальна рухова активність), число підйомів тварини на задні кінцівки («вертикальні стійки» або вертикальна рухова активність), кількість отворів («нірок»), які тварина обнюхала, кількість умивань (актів грумінгу), число болюсів. Тривалість спостереження за поведінкою тварини, включаючи латентний період, становить 3–10 хв.

Як правило, використовують дві групи тварин (контроль і дослід) з метою запобігання повторного пред'явлення тесту «відкрите поле». За умов повторного висаджування у «відкрите поле» інтактні тварини демонструють зменшення рухової (як вертикальної, так і горизонтальної) активності, зменшення кількості досліджених «нірок», збільшується кількість актів грумінгу.

Зменшення рухової активності свідчить про гальмівний вплив на ЦНС, збільшення – про збуджуючу дію.

#### *Методика реєстрації ЕКоГ дрібних лабораторних тварин*

I етап – підготовчий. Проводиться операція живлення хронічних електродів експериментальним тваринам. За 48 год до передбачуваного зняття ЕКоГ хутровий покрив голови тварини епілюється, виконується розріз шкіри голови, очищується надкісниця, висушується і за допомогою трепанатора обережно, під кутом 30° вводяться стерильні електроди, з фіксуванням їх пломбувальною пластмасою.

II етап – зняття ЕКоГ. Проводять з використанням засобу швидкого перетворення Фур'є на підставі спектрального аналізу на епосі 640 мсек у 50% перекритті. Виділяють 4 фізіологічних діапазони: дельта (0,5–3,9 Гц), тета (4,0–7,9 Гц), альфа (8,0–12,9 Гц), бета (13,0–20,0 Гц). По кожному каналу визначають:

- 1) спектральну щільність потужності (СЩП) усередненої Фур'є-реалізації в 4-х частотних діапазонах, наведених в мкВ;
- 2) медіанну частоту, розраховану за усередненою Фур'є-реалізацією, Гц;
- 3) середньоквадратичне відхилення СЩП каналу в поточному діапазоні.

#### Оцінка водно-електролітного обміну:

- 1) тканинна вода (нирки, печінка, шкіра), в т.ч. і за даними морфологічного дослідження [6];
- 2) електроліти Na, K в сечі, крові і тканинах [6].



На стадії доклінічних досліджень важливо встановити розподіл в організмі води і концентрацію електролітів у органах та біологічних рідинах, а також їх виділення з сечею. Отримані дані використовуються для наукового обґрунтування характеру клінічної апробації мінеральної води при порушеннях водного обміну і сольових діатезах.

#### **Перекисне окислення ліпідів**

Перекисне окислення ліпідів (ПОЛ) є нормальним шляхом катаболізму ліпідів клітинних мембран, однак дія пошкоджуючих факторів може спричиняти активацію ПОЛ і, тим самим, викликати декструкцію клітин. Рівень перебігу ПОЛ контролюється антиоксидантною системою. Рекомендується визначення вмісту дієнових кон'югатів, малонового діальдегіду, шифових основ, а також показників, що характеризують стан антиоксидантної системи.

### **5.4. Обсяг досліджень щодо нешкідливості природних мінеральних вод**

Дослідження щодо нешкідливості мінеральних вод рекомендується виконувати у випадку наявності у них біологічної активності. Обсяг досліджень щодо нешкідливості включає вивчення впливу мінеральних вод на функціональний стан основних систем організму: центральної нервової, гепатобіліарної, сечовивідної [11].

## **6. Морфологічні дослідження**

### **6.1. Перелік гістологічних методик**

При дослідженні специфічної активності та нешкідливості мінеральних вод обов'язковою умовою є вивчення морфологічних змін компонентів органів та тканин. Для цього доцільно використовувати як загальні методи гістологічного забарвлення, які дозволяють з'ясувати неспецифічні зміни тканинних структур, так і спеціальні методи забарвлення, які дозволяють встановити порушення чи відновлення в окремих компонентах тканин та органів.

Гематоксилін-еозин – загальна характеристика стану тканинних і клітинних структур (щільність розподілу клітинних елементів; порушення у структурних одиницях органів, стан ядер та цитоплазми, а також зміни мікроциркулярного русла (ступінь повнокров'я, стан судинної стінки, проникність судин, компенсаторні перебудови) [21].

Ван-Гізон із фарбуванням фуксиліном – загальна характеристика судинної системи на рівні великих судин, сполучних тканин, гладеньких м'язів [21].

Нісель (фарбування толуїдиновим синім) – загальна характеристика нервової тканини (стан нейронів, модифікації цитоархітектоники, загальна характеристика гліоцитів [24].

Азокармін Гейденгайна – характеристика стану колагенової стромы [21].

Імпрегнація сріблом за Більшовським – характеристика стану ретикулярної стромы (формуєтворююча тканина) і стану відростків нейронів у нервовій системі [21].

### **6.2. Перелік гістохімічних методик**

Гістохімічні та гістоензиматичні методи досліджень дозволяють визначати вміст хімічних речовин у тканинах та їх локалізацію, а також активність ферментів у клітинах. Останнє дозволяє характеризувати стан метаболізму в різних структурах та частинах органу, а також можливі його порушення.

Гістохімічні реакції виявлення металів у тканинах – визначення кумулятивного ефекту мікро- і макроелементів у досліджуваній мінеральній воді [24].

Гістохімічні реакції визначення активності окислювально-відновних ферментів:

– сукцинатдегідрогеназа (К.Ф. 1.3.99) – загальна характеристика інтенсивності перебігу циклу Кребса [17];

- $\beta$ -оксибутиратдегідрогеназа (К.Ф. 1.1.30) – фермент, що характеризує стан окислювальних реакцій жирних кислот, може служити показником компенсаторних процесів в енергетиці [17];
- лактатдегідрогеназа (К.Ф. 1.1.1.27) – фермент, активність якого дає уявлення про стан гліколізу. Застосована методика дозволяє говорити про зворотню лактатдегідрогеназну реакцію, тобто про реакцію залучення лактату до енергообміну через стадію пірувату [17];
- глутаматдегідрогеназа (К.Ф. 1.4.1.2) – фермент, що характеризує перехід глутамату в  $\alpha$ -кетоглутамат; показує стан використання аварійних енергосубстратів – рівень активності компенсаторно-приспосувальних процесів [17];
- глюкозо-6-фосфатдегідрогеназа (К.Ф. 1.1.1.44) – ключовий фермент пентозофосфатного шляху окислення глюкози; визначення його активності дозволяє судити про рівень утворення і спрямування використання НАДФН, тобто про активність білоксинтезуючих систем і про баланс білоксинтезуючих і енергоутворюючих процесів [17];
- ГАМК-трансaminaза (К.Ф. 2.3.2.13) – фермент, що характеризує процеси метаболізму ГАМК, визначається у формених елементах крові і тканині мозку; дає уявлення про стан стрес-регулюючої системи [35];
- РНК, ДНК, загальний білок – оцінка стану обміну нуклеїнових кислот, рівня активності білоксинтезуючих систем (домінування катаболізму або анаболізму в клітинах) [21].

### 6.3. Оцінка результатів морфологічних досліджень

При дослідженні гістологічних препаратів початково оцінюється збереженість внутрішньо-органної структури, стан судинного і, особливо, мікроциркулярного русла. Вивчається і характеризується структура основних клітинних елементів органу: ядра (форма, розміри, розташування хроматину); цитоплазми (хромність, щільність, вакуолі тощо); елементи, що гинуть; стан водно-сольового обміну (набряки).

Для оцінки опосередкованої дії мінеральних вод, окрім обов'язкової оглядової якісної характеристики ЦНС, слід проводити кількісні (морфометричні) дослідження. Найінформативнішими при використанні стандартної морфометричної сітки [1] можуть бути такі показники:

1) відносний вміст (%%) змінених форм нейронів (розрахунок  $\pm 300$  клітин) з явищами хроматолізу, пікнозу, вакуолізації тощо. У таблиці 6 наведено ознаки, за сукупністю яких можна визначити належність нейрону до одного з 4 основних структурно-функціональних типів. Обов'язковим є визначення індексу альтерації – відношення числа змінених нейронів до загального числа розрахованих нейронів (цей показник дозволяє визначити глибину структурно-функціональних модифікацій нейрону або глибину відновлення порушень);

2) об'єм ядра нейронів або гліоцитів ( $\pm 50$  клітин) – показник, що дозволяє судити про активність реактивних процесів і опосередковано про глибину пошкоджень.

$$V = \pi/6 \cdot \alpha \cdot \beta^2,$$

де  $V$  – об'єм ядра;

$\alpha$  – малий діаметр ядра;

$\beta$  – великий діаметр ядра;

$\pi$  – величина пі (3,14);

3) нейрогліальний індекс – відношення числа гліоцитів до числа нейронів. Обчислення проводиться після підрахунку тих та інших на 40–80 полях зору стандартної морфометричної сітки;

4) перинейрональний індекс – відношення числа сателітів до числа нейронів. Сателіти (перинейрональна глія) – гліоцити, центр ядра яких розташовується на відстані, більшій ніж 1 мкм від ядра найближчого нейрона;

5) щільність розподілу гліоцитів або нейронів – кількість клітин на одиницю площі (характеризує набряклість мозкової речовини, набухання її).

*Структурні ознаки типів функціональної активності нейронів*

Типи	Види нейронів	Структурні ознаки
Нормохромний, I тип	Нормохромні нейрони	Розміри тіла у межах описаної норми; межа чітка, світле ядро розташоване в центрі, ядрце середніх розмірів лежить в центрі ядра, хроматин дифузно розподілений по ядру, хроматофільні гранули середніх і малих розмірів лежать рівномірно по цитоплазмі.
Гіпохромний, II тип	Нейрони з центральним хроматолізом	Розміри тіла збільшені; межа чітка, ядро велике, світле, розташовується концентрично або ексцентрично, ядрце звичайно велике; хроматин крупнопетлистий з невеликою кількістю дрібних брилок, хроматофільна речовина середньо- і дрібнобриласта, розташовується в цитоплазмі пухко, навколо ядра смуга лізису.
	Нейрони з периферійним хроматолізом	Розміри тіла збільшені; межа чітка, але не завжди; ядро велике, світле, розміри ядрця варіабельні; хроматофільна речовина середньо- і дрібнобриласта, під оболонкою зона вільна від нього.
Гіперхромний, III тип	Темні нейрони	Розміри звичайні; форма тіла подовжена, межі чіткі; ядро округле середніх або великих розмірів, гомогенна інтенсивно пофарбована цитоплазма.
	Ішемізовані нейрони	Розміри зменшені, інколи звичайні, різко витягнута форма; інколи шпопороподібний аксон, цитоплазма гомогенна темнозабарвлена; ядро тригранної форми, темне, витягнене; або вміст клітини темний, нерозпізнавальний.
Підвищена функціональна активність, IV тип	Клітини з ознаками підвищеної функціональної активності	Розміри тіла збільшені; межі тіла чіткі; ядро велике, світле; хроматин крупнобриластий, сконцентрований під оболонкою ядра; ядрце велике, темне, інколи їх декілька, хроматофільна речовина крупнобриласта, нормохромна.

Частина цих показників – відносний вміст змінених клітинних форм; об'єм ядра; щільність розподілу елементів, можуть бути використані для структурно-функціональної характеристики паренхіматозних органів (печінка, надниркові залози, серце, залози).

## 7. Імунологічні дослідження

### 7.1. Визначення показників, що характеризують стан неспецифічної резистентності організму

Рекомендується визначити вміст комплементу в сироватці крові та активність фагоцитів периферичної крові.

#### Визначення рівня комплементу у сироватці крові

Метод ґрунтується на тому, що всі реакції антиген-антитіло відбуваються тільки за умов присутності комплементу та виявляються у вигляді гемолізу еритроцитів барана. Існує залежність між ступенем гемолізу та кількістю комплементу. Метод полягає у визначенні гемолітичної активності комплементу за мінімальною кількістю свіжої досліджуваної сироватки, яка необхідна для 50% лізису  $1\text{ см}^3$  еритроцитів гемолітичної системи при  $37^\circ\text{C}$  за 30 хв.

#### Хід визначення

Активну сироватку розливають у 8 пробірок дозами від  $0,015\text{ см}^3$  до  $0,085\text{ см}^3$ . Сироватку доводять розчином хлориду натрію до об'єму 0,5 см.

№ пробірки Інгредієнти, $\text{см}^3$	1	2	3	4	5	6	7	8
Сироватка	0,015	0,025	0,035	0,045	0,055	0,065	0,075	0,085
Розчин хлориду натрію	0,485	0,475	0,465	0,455	0,445	0,435	0,425	0,415

## Оцінка специфічної фармакологічної активності лікарських засобів

Далі в кожну пробірку додають по 1 см<sup>3</sup> стандартної гемолітичної системи. Разом з дослідними пробами ставлять контроль комплементу з 0,75 см<sup>3</sup> дистильованої води та 0,75 см<sup>3</sup> гемосистеми (тут буде розглядатися 50% гемоліз). Усі пробірки струшують та ставлять у термостат при 37°C на 30 хв. Після інкубації проби охолоджують у холодильнику 10 хв при температурі 2–4°C, далі – центрифугують 5 хв при 1000 об./хв. Надосадну рідину колориметрують, використовуючи розчин хлориду натрію як розчин порівняння, у кюветах товщиною 0,3 см при довжині хвилі 440 нм (синій світлофільтр). Відсоток гемолізу розраховують за чисельним показником екстинкції за кривою гемолізу. Фотометрують звичайно ту дослідну пробірку, яка за кольором та прозорістю відповідає контрольній пробірці. Знаючи вихідну дозу сироватки в цій дослідній пробірці та використовуючи коефіцієнт відхилення Крота, можна розрахувати титр комплементу в 1 см<sup>3</sup> незбираної сироватки (С' Н<sub>50</sub>) за формулою: (К·1)/А, де

К – коефіцієнт відхилення Крота;

А – доза сироватки у пробірці зі ступенем гемолізу близьким до 50%.

Гемоліз	Коефіцієнт	Гемоліз	Коефіцієнт	Гемоліз	Коефіцієнт	Гемоліз	Коефіцієнт
10	0,644	25	0,803	55	1,041	82	1,354
12	0,671	30	0,844	60	1,084	84	1,393
14	0,697	35	0,884	65	1,132	86	1,438
16	0,718	40	0,922	70	1,185	88	1,490
18	0,738	45	0,961	75	1,246	90	1,552
20	0,758	50	1,000	80	1,320		

Приклад розрахунку: припустимо, встановили за кривою гемолізу, що у дослідній пробірці відсоток гемолізу дорівнює 45. Цьому відсотку відповідає коефіцієнт відхилення Крота – 0,961. Відомо, що в цій пробірці знаходилось 0,015 см<sup>3</sup> сироватки. Поділивши коефіцієнт відхилення на дозу сироватки, визначають титр комплементу у 1 см<sup>3</sup> незбираної сироватки, тобто

$$\frac{0,961 \cdot 1}{0,015} = 64,06 \text{ гемолітичних одиниць}$$

Отже, титр комплементу сироватки дорівнює 64,1 С' Н<sub>50</sub>.

### Визначення фагоцитарної активності нейтрофілів

Здатність клітин фагоцитувати, перетравлювати мікроби є захисною функцією організму, одним з факторів природного імунітету.

Метод базується на підрахунку кількості пофарбованих клітин (нейтрофілів) за допомогою світлового мікроскопу і дозволяє знайти кількість фагоцитуючих клітин (Fa) та об'єктів фагоцитозу (Fi – дріжджових клітин), які поглинуті нейтрофілами.

### Хід визначення

У стерильну відалевську пробірку з антикоагулянтом наливають 0,3 см<sup>3</sup> крові та 0,1 см<sup>3</sup> 0,25% зависі дріжджових клітин. Суміш інкубують у термостаті при температурі 37°C протягом 30 хв. За цей час суміш декілька разів струшують. Після закінчення інкубації вміст пробірки перемішують та за допомогою пастерівської піпетки переносять краплю суміші на предметне скло, попередньо знежирене сумішню Никифорова, та роблять мазок. Мазок підсушують на повітрі при кімнатній температурі, фіксують протягом 2–3 хв у розчині еозину метиленового за Май-Грюнвальдом та фарбують розчином азури-еозину за Романовським 20–30 хв. Фарбу зливають, мазки промивають водою та підсушують.

Облік проводять під імерсійною системою мікроскопу при ОБх7, ОКх90. У кожному мазку нараховують не менше 100 нейтрофілів, одночасно відмічаючи відсоток нейтрофілів, які виявляють фагоцитарну активність (Fa), та кількість дріжджових клітин, поглинутих одним фагоцитом. Фагоцитарний індекс (Fi) розраховують шляхом ділення загальної кількості утриманих нейтрофілами об'єктів фагоцитозу на кількість клітин, що фагоцитують. Наприклад: із 100 нейтрофілів – 60 такі, що фагоцитують; загальна кількість утриманих ними дріжджових клітин дорівнює 180. Отже, відсоток фагоцитозу (Fa) становить 60, а Fi дорівнює 180:60=3,0.

## 7.2. Визначення реакцій, які свідчать про ушкодження органів

Рекомендується визначити вміст антитіл до тканинних антигенів та вміст циркулюючих імунних комплексів.

### **Визначення титру циркулюючих антитіл до антигенів, виготовлених з трупної тканини, реакцією зв'язування комплементу на холоді**

Метод ґрунтується на визначенні комплексу антиген-антитіло, що утворюється за наявності в дослідній крові антитканинних антитіл та зв'язує комплемент. Заміщений незв'язаний комплемент визначають гемолітичним методом. Ступінь гемолізу сенсibiliзованих еритроцитів прямо пропорційний кількості комплементу та служить індикатором наявності або відсутності у сироватці аутоантитіл.

#### **Хід визначення**

Для проведення реакції беруть 0,1 см<sup>3</sup> сироватки, що аналізується, додають 0,9 см фізіологічного розчину та інактивують протягом 20 хв на водяній бані при температурі 56°C. Отримують розведення 1:10; з цього розведення беруть 0,1 см<sup>3</sup>, додають 0,1 см<sup>3</sup> фізіологічного розчину та отримують розведення 1:20.

Методом перекатування готують розведення 1:10; 1:20; 1:40; 1:80; 1:160. З кожного розведення сироватки беруть по 0,1 см<sup>3</sup>, додають 0,1 см<sup>3</sup> антигену в робочій дозі. Паралельно готують контроль антигену: до 0,1 см<sup>3</sup> комплементу додають 0,1 см<sup>3</sup> фізіологічного розчину. В контроль комплементу входить: 0,1 см<sup>3</sup> комплементу та 0,2 см<sup>3</sup> фізіологічного розчину.

Пробірки залишають на 18 год у холодильнику при температурі 4°C.

Після експозиції пробірки переносять до термостату на 30 хв при 87°C. Далі додають у всі пробірки по 0,2 см<sup>3</sup> гемолітичної системи. Розрахунки ведуть через 30 хв після того, як відбудеться гемоліз в контролі.

За титр реакції вважають максимальне розведення сироватки з затримкою гемолізу.

#### **Метод визначення рівня циркулюючих імунних комплексів (ЦІК)**

Метод ґрунтується на селективній преципітації комплексів антиген-антитіло у 3,7% та 7% розчинах поліетиленгліколю м.в. 6000.

#### **Проведення аналізу**

0,2 см<sup>3</sup> сироватки крові вливають у центрифужну пробірку і додають 4,8 см<sup>3</sup> боратного буферу. Далі відбирають 4 см<sup>3</sup> розчиненої сироватки та додають 4 см<sup>3</sup> 7% розчину ПЕГ і залишають у холодильнику при температурі 4°C на 18 год. Після охолодження пробірку центрифугують 20 хв при 12000 об./хв у холоді. Надосадну рідину зливають, у пробірку додають 4 см<sup>3</sup> 3,5% розчину ПЕГ та центрифугують 20 хв при 12000 об./хв.

Осад розчиняють у 5 см<sup>3</sup> 0,1 М NaOH. Розчин колориметрують на спектрофотометрі при довжині хвилі 230 нм (дейтерієва лампа).

Кількість ЦІК у сироватці крові визначають за допомогою графіку, побудованого з використанням різних розведень агрегованого гама-глобуліну. Результати відображають у мг білку на 1 см<sup>3</sup> сироватки.

Методики рекомендується виконувати згідно з існуючими методичними рекомендаціями МОЗ України «Унифицированные иммунологические методы обследования больных на стационарном и амбулаторном этапах лечения» (Київ, 1988 р.).

## **Висновки**

Наведена схема (Додаток) доклінічних випробувань мінеральних вод передбачає обов'язкову комплексність і системність використання наведених методик. Доклінічні випробування проводяться поетапно: 1) фізико-хімічні і мікробіологічні дослідження для з'ясування типу мінеральної води; 2) фізіологічні, біохімічні і морфологічні дослідження для визначення біо-

логічної активності мінеральної води; 3) біохімічні та морфологічні дослідження для визначення нешкідливості мінеральної води. При цьому встановлений тип води обумовлює відповідний набір методик для наступного етапу.

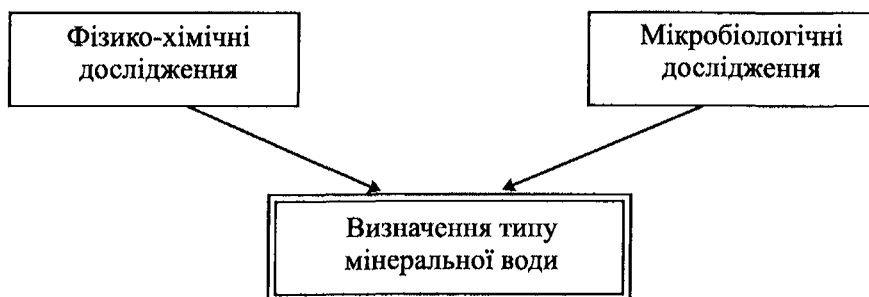
Доклінічні дослідження мінеральних вод за оптимальними параметрами дозволяють виявити основні механізми лікувальної дії мінеральної води. Критерієм оцінки біологічної дії мінеральних вод є отриманий мінімальний статистично достовірний терапевтичний ефект.

Застосування уніфікованих адекватних методик у комплексному доклінічному дослідженні мінеральних вод дозволить науково обґрунтувати та розробити диференційовані рекомендації для подальшого клінічного випробування цих вод з метою з'ясування їхньої терапевтичної ефективності та нешкідливості.

Додаток

**СХЕМА**  
етапів доклінічного вивчення біологічної активності та нешкідливості мінеральних вод України

*I етап*



*II етап*



## Література

1. Автандилов Г.А. Морфометрия.– М.: Медицина.– 1979.– 92 с.
2. Алексеенко Н.А. Водно-солевой обмен у животных при курсовом приеме слабоминерализованной воды, содержащей органические вещества: Автореф. дисс. ... канд. мед. наук.– К., 1978.– 24 с.
3. Алексеенко Н.А., Булитко Г.Г., Николенко С.И. и др. Метаболические сдвиги у животных в ответ на введение слабоминерализованных вод с различным содержанием групп органических веществ//Курортол. и физиотерапия.– К.: Здоров'я, 1986.– Вып.19.– С. 30–32.
4. Бабинец А.Е., Моисеева Н.П., Крыжко Г.Г. Изучение кинетики изменения неорганического состава подземных минеральных вод типа Нафтуса при хранении//Геол. журн.– 1978.– Т.38, № 4.– С. 99–106.
5. Бабов К.Д., Серебряна Л.А., Беліченко Т.А. та ін. Застосування мінеральних вод Миргородського типу для лікування захворювань органів травлення/Метод. рекомендації.– Одеса, 1996.– 36 с.
6. Берхин Є.Б., Иванов Ю.І. Засоби експериментального дослідження нирок і водно-солевого обміну.- Барнаул, 1972. –199 с.
7. Минеральные лечебно-столовые воды Украины. Справочник/Под ред. К.Д.Бабова, М.В.Лободы, Е.М.Никипеловой.– Коломия: Вис, 1998.– 207 с.
8. Беліченко Т.А., Бабов К.Д., Нікіпелова О.М. та ін. Застосування мінеральної води «Бронічанка» в відновлювальному лікуванні захворювань органів травлення/Метод. рекомендації.– Одеса, 1998.– 24 с.
9. Санаторный этап реабилитации больных ишемической болезнью сердца/Под ред. В.А.Боброва, И.К.Следзевской.– К.: Здоров'я, 1995.–112 с.
10. Гаске О.Д., Капская Е.И. Влияние вод новых скважин Трускавецкого месторождения на желчеобразовательную функцию печени//Курортол. и физиотерапия.– К.: Здоров'я, 1990.– Вып.13.– С. 81–85.
11. Гацура В.В. Методы первичного фармакологического исследования биологически активных веществ.– М.: Медицина, 1974.– 143 с.
12. Дмитриева Г.А. Значение сульфат-ионов в механизме действия питьевых минеральных вод: Автореф. дисс. ... канд. мед. наук.– М., 1976.– 18 с.
13. Зарецкий И.И. Клиническая физиология и методы функциональной диагностики почек. М., 1963.– С. 239–241.
14. Иванов В.В., Невраев Г.А. Классификация подземных минеральных вод.– М.: Недра, 1964.–168 с.
15. Ивченко Г.И, Кушманова О.Д. Руководство по практическим занятиям по биологической химии.–М.: Медицина, 1966.– С. 225–226.
16. Колб В.Г., Камышников В.С. Справочник по клинической химии.– Минск: Беларусь, 1982.– С. 81–84.
17. Ллойд и др. Гистохимия ферментов.– Л.: Медицина, 1982.
18. Мінеральні води Закарпаття. Питне лікувальне використання/Під ред. М.В.Лободи, Л.П.Киртич.–Ужгород: ІВА, 1997.– 174 с.
19. Максимович К.А., Юникова С.И., Померанц М.Л. Критерии микробиологической оценки вод типа Нафтуса//Физические и курортные факторы и их лечебное применение.– К.: Здоров'я, 1975.– Вып.9.– С. 19–21.
20. Марачев А.Г., Жаворонков А.А. Акклиматизационный дефицит железа//Физиология человека.– 1987.– Т.13, № 4.– С. 640–646.

21. Меркулова Г.А. Курс патогистологической техники.– Л.: Медгиз, 1961.– С. 141–144.
22. Мирошниченко В.П., Гайдай В.Н. А.С. № 874029, бюлл. № 39 23.10.81.
23. Орехович В.Н. Современные методы биохимии.– М., 1997.– С. 49–68.
24. Пирс Е. Гистохимия.– М.: Мир, 1962.– С. 143–157.
25. Попович И.Л. Механизм действия минеральной воды Нафтуса на секреторную функцию желудка (экспериментально-клиническое исследование): Автореф. дис. ... канд. мед. наук.– К., 1987.– 22 с.
26. Попович И.Л., Бутусова И.А., Ивасивка С.В. Гастропротективное действие люминального гастрина//Физиол. журн.– 1991.– Т.37, № 5.– С. 117–120.
27. Попович И.Л., Ивасивка С.В., Ясевич А.П. и др. Защитное действие органических веществ воды Нафтуса на эрозивно-язвенные повреждения слизистой желудка у крыс при иммобилизационно-холодовом стрессе//Физиол. журнал.– 1990.– Т.36, № 4.– С. 68–76.
28. Серебряна Л.А., Кенч В.В., Горчакова Г.А. Водолечение.– К.: Здоров'я, 1983.– 168 с.
29. Немедикаментозное лечение в клинике внутренних болезней/Под ред. Л.А.Серебряной, Н.Н.Середюка, Л.Е.Михно.– К.: Здоров'я, 1995.– 528 с.
30. Фердман Д.Л., Сопин Е.Ф. Практикум по биологической химии.– М., 1957.– С. 113–114.
31. Флюнт И.С., Скоробогатов Н.А., Есиленко Б.Е. и др. Экспериментальное и клинико-физиологическое изучение функции почек при курсовом приеме минеральной воды Нафтуса//IV Всес. конф. по водно-солевому обмену и функции почек.– Черновцы, 1974.– С. 164.
32. Щерба М.М., Петров В.Н., Рысс Е.С. Железодефицитные состояния. – Л.: Наука, 1975.–264 с.
33. Щерба М.М. Всасывание железа//Физиология всасывания.– Л., 1977.– С. 223–248.
34. Физиологические основы лечебного действия воды Нафтуса/Яременко М.С., Ивасивка С.В., Попович И.Л. и др.; АН УССР. Ин-т физиологии им.А.А.Богомольца; Отв.ред. М.С.Яременко.– К.: Наук. думка, 1989.–128 с.
35. Kugler P., Baier G.//Microphotometric determination of enzymes in brain sections. II GABA Transaminase//Histochemistry.– 1990.– V.5.– P. 501–505.
36. Fisher J., Tavazek J.//Clin. Chem.– 1975.– V.31.– P. 166.



## ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНЕ ВИВЧЕННЯ БІОСТИМУЛЯТОРІВ З ПРИРОДНОЇ СИРОВИНИ

Соловйова В.П.,

Сотнікова О.П.,

Лотош Т.Д.

### Вступ

Гостра необхідність створення ефективних лікарських засобів з природної сировини для профілактики та лікування різноманітних захворювань пов'язана, перш за все, з негативним впливом несприятливих екологічних та стресорних факторів на стан здоров'я та працездатність людини.

Доклінічну фармакологічну оцінку особливо важко проводити для лікарських засобів з натуральної сировини (рослинного, тваринного, геоорганічного походження), призначених для стимуляції неспецифічної резистентності та адаптаційних можливостей організму. Це пов'язано, в першу чергу, з наявністю у препаратах названої групи складних комплексів біологічно активних сполук з широким спектром фармакологічної дії та біорегулюючим впливом на різні захисні системи організму при практично повній нешкідливості. Зазначені фактори визначають широкий діапазон застосування таких препаратів як в монотерапії, так і в комбінації зі специфічними лікарськими засобами [5, 6, 12, 19, 21].

У лабораторії фармакології та тканинної терапії Інституту очних хвороб і тканинної терапії ім. В.П.Філатова АМН України вдосконалені і практично реалізовані тести об'єктивної експериментальної оцінки лікувально-профілактичної ефективності біопрепаратів.

Різнманітність існуючих методів тестування дозволяє виявити індивідуальну специфічність і спрямованість дії біопрепарату в межах адаптаційних можливостей. В основі тестів з визначення рівня біологічної активності і лікувальної ефективності препаратів біогенного походження лежать властивості останніх активувати ріст і розмноження клітин, прискорювати процеси регенерації, поліпшувати перебіг і зменшувати наслідки кисневого голодування, впливати на обмін речовин, спричиняти антистресорну і антитоксичну дії, підвищувати загальний опір організму. Активність тканинних препаратів перевіряється також за їх здатністю підсилювати фагоцитарні властивості лейкоцитів [9, 13, 16, 18, 22].

Для визначення біостимулюючих властивостей використовуються такі тести:

**Дріжджовий тест.** Базується на здатності препаратів прискорювати ріст і розмноження дріжджових клітин. За величиною екстинкції, визначеною за допомогою фотоколориметра, встановлюють процент активності препарату [2, 10, 14, 17, 22].

**Тестування регенеруючих властивостей.** Активність біопрепаратів визначають за швидкістю загоєння відтворених дефектів (стандартної величини) роگیвки ока жаби чи шкіри вуха кроля [22].

**Тест парабіозу.** Дію препарату оцінюють за швидкістю виходу ізольованого м'яза жаби зі стану парабіозу [2, 6, 10, 14, 15, 17, 22].

**Антитоксичні тести.** Грунтуються на спостереженнях, які довели, що після введення біопрепаратів в організм тварин знижується токсичність специфічних агентів типу строфантину, стрихніну, дикумарину, ціаністого натрію [2, 8, 11, 14, 20, 22].

Рекомендується вивчати:

– вплив попереднього введення біопрепаратів на тривалість роботи серця жаби після ін'єкції строфантину;

– вплив попереднього введення біопрепаратів на виживання та тривалість життя білих мишей при отруєнні їх стрихніном (або іншим токсикантом).

**Фагоцитарний тест.** Ґрунтується на здатності біопрепаратів достовірно підвищувати фагоцитарну активність лейкоцитів [1, 6, 8, 19, 23].

**Кисневе голодування.** Викликають у білих мишей введенням нітриту натрію (гіпоксія змішаного типу) і нітропрусиду натрію (гістотоксична гіпоксія) на фоні попереднього введення досліджуваного біопрепарату. Про вплив лікарського засобу на опірність організму до даного виду кисневого голодування роблять висновок з тривалості життя і виживання тварин [2, 6, 7, 8, 14, 16, 22].

**Визначення протисудомної дії** біопрепаратів при введенні коразолу. Методика ґрунтується на здатності препаратів біогенного походження впливати на розвиток генералізованих судом при введенні деяких конвульсантів: коразолу, стрихніну, пікротоксину, бікукуліну, тіосемікарбазиду.

**Визначення протекторної дії** біопрепаратів при відтворенні епілептиформного осередку. Методика ґрунтується на здатності біопрепаратів зменшувати осередок збудження в корі головного мозку тварин, викликаний пеніциліном (гострий дослід), або лізованою гомокров'ю (хронічний дослід) [3, 4, 24].

**Моделювання захворювань у тварин.** До таких належать: анемія (введення фенілгідразину, спленектомія – видалення селезінки), міокардіодистрофія, хронічний гепатит, виразка шлунку (введення серотоніну, дозована іммобілізація), атеросклероз, оваріоектомія, редукція зубної залози, імунодефіцит (введення циклофосфану), хронічна епілептизація мозку (фармакологічний кіндлінг), вплив іонізуючої радіації.

Запропоновані моделі хвороб чітко виявляють різницю дії біогенних препаратів між профілактичним (до відтворення хвороби) і лікувальним їх введенням.

Оцінку ефективності досліджуваних препаратів необхідно проводити не менше ніж по трьох тестах і на одній моделі хвороби.

## Методики визначення активності біостимуляторів

### 1. Визначення активності біопрепаратів на дріжджовому тесті

Тест ґрунтується на здатності біогенних препаратів прискорювати ріст і розмноження дріжджових клітин. Ефект оцінюється колориметричним методом (при довжині хвилі  $582 \pm 10$  нм).

Досліди проводяться на чистій культурі дріжджів (*Saccharomyces cerevisiae*, штам 47) за стерильних умов. Попередньо готують дріжджову суспензію (водний розчин 3-добової дріжджової культури з оптичною густиною 0,05–0,06 од.), яку розливають в стерильні пробірки. Потім в дослідні пробірки додають 1 мл досліджуваного препарату і 5 мл розчину Рідера, а в контрольні – відповідну кількість фізрозчину.

Пробірки поміщають в термостат при 28°C. Через 17–20 годин вимірюють екстинкцію контрольних і дослідних проб і за різницею показників судять про активність препарату.

Розрахунок ведеться у відсотковому вираженні (контроль приймають за 100%).

### 2. Тестування регенеруючих властивостей біопрепаратів

Тест ґрунтується на здатності препаратів біогенного походження прискорювати регенерацію штучного дефекту роги́вки ока жаби.

В експерименті використовують 5–7 жаб. Жабу знерухомлюють. Ізолювання очей здійснюють гострокінцевими вигнутими очними ножицями. Одне око жаби йде як контроль, друге – як дослід. По центру роги́вки обох ізольованих очей жаби трепаном ( $d=1,5$  мм) наносять контури дефекту. Гострим скальпелем, під контролем біокулярної лупи видаляють епітелій в межах контуру для одержання однакових стандартних дефектів. Дослідне око занурюють у розчин досліджуваного препарату, а друге (контрольне) – у розчин Рінгера на 8–16 год при температурі

18–20°C. Після цього очі жаби занурюють у 0,005% розчин нейтрального червоного на 45–60 хв для забарвлення дефекту. Рогівки відрізають, розправляють на предметному склі і поміщують під мікроскоп при однаковому збільшенні. За допомогою рисувального апарату контури дефектів переносять на папір для наступного вимірювання довжини кола за допомогою планіметра.

Про ступінь прискорення епітелізації роблять висновки з величини достовірної різниці планіметричних змін між контролем і дослідом.

### 3. Визначення рівня біологічної активності біопрепаратів на тесті парабіозу

Принцип методу: визначення біологічної активності базується на здатності біопрепарату відновлювати збудливість ізольованого м'язу жаби, що знаходиться в стані парабіозу.

Відбір жаб і їх утримання проводиться згідно з Державною фармакопеєю (ХІ, вип. 2, с. 165)

Для проведення тесту відбирають 5–7 жаб, близьких за масою, знерухомлюють, закріплюють на дошці, видаляють кравецькі м'язи обох кінцівок, після чого тварин піддають евтаназії. Парні кравецькі м'язи занурюють в 1% розчин хлористого калію кімнатної температури до настання парабіозу (м'яз не відповідає скороченням на подразнення електростимулятора ЕСЛ-2 чи ЕСУ-2). Характер збудження перевіряють при напрузі 2,4 В поодинокими імпульсами (тривалістю 100 мс при міжелектродній відстані 2–3 мм). У цьому стані один з м'язів занурюють в досліджуваний розчин препарату (дослід), другий в розчин Рінгера (контроль). Визначають час (у хв) відновлення скорочувальної функції ізольованих м'язів жаби, контролюючи її кожні 2 хвилини.

Обчислюють середнє значення часу відновлення скорочувальної функції м'язів у контролі та досліді (позначення згідно з ДФ Х1, вип. 1, с. 199). Досліджувана величина (А), що характеризує біологічну активність препарату визначається за такою формулою:

$$A = \frac{(x - y) \cdot 100 \%}{x}$$

де А – рівень біологічної активності (в %);

х – середній час відновлення скорочувальної функції м'язів у контролі;

у – середній час відновлення скорочувальної функції м'язів у досліді. Показник рівня біологічної активності (А) повинен бути не менше ніж 20%.

### 4. Визначення антитоксичної дії біопрепаратів при введенні строфантину («строфантинний тест»)

Тест ґрунтується на здатності біологічних препаратів знижувати токсичність речовин. Реєструють тривалість роботи серця жаби *in situ* після ін'єкції строфантину в субтоксичній дозі на фоні попереднього введення досліджуваного препарату.

Після закінчення курсового введення досліджуваних речовин протягом 10 днів дослідних і контрольних (без введення препарату і не менше ніж 7 особин у кожній групі) жаб знерухомлюють і розрізають грудну клітку для спостереження за роботою серця. Всім тваринам підшкірно вводять 0,05 % розчин строфантину К з розрахунку 0,2 мл на 10 г маси і реєструють тривалість роботи серця у хвилинах.

Про біологічну активність досліджуваних препаратів судять за статистично достовірною різницею отриманих результатів у дослідних і контрольних жаб.

### 5. Визначення антитоксичної дії біопрепаратів при введенні стрихніну («стрихніновий тест»)

Тест ґрунтується на здатності біогенних препаратів підвищувати резистентність організму до токсичного впливу стрихніну.

Дослід проводять на нелінійних мишах – самцях масою 18–22 г (не менше ніж 30 тварин в кожній групі).

Після попереднього курсового введення досліджуваного препарату протягом 10 днів всім дослідним і контрольним (без введення препарату) тваринам підшкірно вводять в смертельній дозі ( $LD_{99}$ ) 0,01% розчин стрихніну нітрату з розрахунку – 0,2 мл на 10 г маси тварини.

Реєструють тривалість життя (хв) і виживання (%) мишей контрольної та дослідної групи. Про активність препарату судять за статистично достовірною різницею цих показників у контрольних і дослідних тварин.

### **6. Оцінка біопрепаратів за фагоцитарним тестом**

Визначення ґрунтується на здатності препаратів підвищувати фагоцитарну активність нейтрофільних лейкоцитів.

Дослід проводять на мурчаках, яким досліджуваний препарат вводять протягом 7 днів. Потім з вени вуха мурчака беруть 20 мкл крові змішують з 10 мкл 4% розчину лимоннокислого натрію і додають 10 мкл 2-міліардної інактивованої культури золотистого стафілококу (штам 209)\*.

Після 20-хвилинної інкубації при 37°C роблять мазки крові, фіксують і фарбують за Гімза-Романовським.

Підраховують кількість фагоцитованих мікробів в 50 чи 100 лейкоцитах. Результати тестування визначають за показником фагоцитарного числа шляхом ділення загального числа фагоцитованих бактерій на число підрахованих нейтрофільних лейкоцитів. За контрольні правлять показники інтактних мурчаків і вихідний фон у кожної тварини в досліді.

Результати піддають статистичній обробці.

### **7. Визначення антигіпоксичної дії біопрепаратів**

#### ***Введення нітриту натрію***

Тест ґрунтується на здатності препаратів підвищувати резистентність організму до впливу токсичних доз азотистокислого натрію, який викликає кисневе голодування змішаного типу (утворення метгемоглобіну, зниження артеріального тиску).

Дослід проводять на нелінійних білих мишах, яким попередньо протягом 10 днів вводять досліджуваний препарат.

Результати біотестування оцінюють за статистично вірогідною різницею у тривалості життя дослідних і контрольних мишей (без введення препарату) після одноразової підшкірної ін'єкції 1,5% розчину нітриту натрію (0,2 мл/10 г маси).

#### ***Введення нітропрусиду натрію***

Методика ґрунтується на здатності препаратів знижувати ступінь порушення клітинного метаболізму та гіпоксії тканин, викликаних нітропрусидом натрію. Дослід ставлять на нелінійних білих мишах (не менше 10 у кожній групі), яким попередньо за 1–3 години вводять досліджуваний препарат.

Гістотоксичну гіпоксію викликають внутрішньоочеревинним введенням нітропрусиду натрію в дозі 20 мг/кг маси.

Активність препарату визначають за статистично достовірною різницею у тривалості життя дослідних і контрольних мишей.

### **8. Визначення протисудомної дії біопрепаратів при введенні коразолу**

Тест ґрунтується на здатності препаратів знижувати конвульсивний вплив коразолу (пен-тилететразолу) при його одноразовому або тривалому введенні. В експерименті використовують білих нелінійних мишей масою 25–30 г і білих щурів масою 250–300 г (не менше 10–15 тварин в кожній групі).

---

\* Для вивчення реакції фагоцитозу можна використовувати і інші загальноприйняті методи.

Гострий напад клоніко-тонічних судом відтворюють одноразовою внутрішньоочеревинною ін'єкцією коразолу в пороговій дозі (50–60 мг/кг залежно від чутливості експериментальних тварин) після попереднього двотижневого введення досліджуваного препарату.

Судомну готовність головного мозку (коразоловий кіндлінг) відтворюють шляхом 10-денного введення досліджуваного препарату з наступним одночасним щоденним внутрішньоочеревинним введенням хемоконвульсанту в підпороговій дозі (20–25 мг/кг для мишей і 30–35 мг/кг для щурів) протягом 20 днів.

Реєструють характер судом, тяжкість судомного нападу і порушення поведінки за допомогою тесту «відкрите поле». Судомні прояви оцінюють за шестибальною шкалою [4, 24].

Про активність препарату роблять висновки за статистично достовірними відмінностями між показниками контрольних (введення ізотонічного розчину NaCl) і дослідних (введення досліджуваного препарату) тваринами.

### 9. Визначення протекторної дії біопрепаратів при відтворенні епілептичного осередку

Тест ґрунтується на здатності біопрепаратів зменшувати осередок збудження у корі головного мозку тварин, викликаний натрієвою сіллю бензилпеніциліну (*Benzylpenicilinum – natrium*). Дослід проводять на нелінійних щурах-самцях масою 250–300 г (по 7–10 тварин в кожній групі).

Досліджуваний препарат попередньо вводять протягом 10–15 днів. Епілептичний осередок створюють шляхом введення мікроін'єктором в сенсомоторну частину кори мозку щурів 5 мкл розчину пеніциліну в концентраціях від 0,3% до 1% на глибину 180–200 мкм (за допомогою стереотаксу).

Оцінку здатності досліджуваного препарату знижувати вираженість осередку збудження в корі головного мозку і призупиняти його поширення проводять за статистично достовірною різницею коефіцієнта потужності осередку фокальних пікхвильових потенціалів у контрольних і дослідних тварин.

## Література

1. Голубева Н.М. Фагоцитарная реакция как показатель активности экстракта алоэ//Тр. Воронежск. зоовет. ин-та.– 1957.– Т.15.– С. 163–167.
2. Запороженко О.М., Соколова Б.Н., Шерина Н.М. Биологические критерии оценки качества тканевых препаратов//Биотехнология получения кормового белка, экологически чистых препаратов, повышающих урожайность, премиксов – ферментов и витаминов кормового назначения.– Днепрпетровск, 1990.– С. 119.
3. Иванов В.И. Применение торфота в комплексном лечении эпилепсии (экспериментальное исследование): Автореф. дисс. ... канд. мед. наук.– Одесса, 1994.
4. Крыжановский Г.Н., Шандра А.А., Макулькин Р.Ф., Годлевский Л.С. Гиппокамп как детерминантная структура, генерирующая эпилептическую активность при коразоловом киндлинге//Бюлл. эксперим. биол.– 1985.– Т.99, №5.– С. 527–532.
5. Логай И.М., Соловьева В.П., Сотникова Е.П. Тканевая терапия по В.П.Филатову, основные направления и перспективы//Здоровье.– 1995.– №2.– С. 7–10.
6. Лотош Т.Д. Гумат натрия из торфа как фактор повышения неспецифической резистентности: Автореф. дисс. ... канд. мед. наук.– Львов, 1985.
7. Лотош Т.Д., Абрамова А.Б. Коррекция гипоксии природными биорегуляторами//Тез. докл. XIV съезда Укр. физиол. об-ва им. И.П.Павлова.– К., 1994.– С. 127.
8. Мамаду С. Влияние комплекса торфота и витамина В6 на резистентность организма: Автореф. дисс. ... канд. мед. наук.– Кишинев, 1985.
9. Мучник С.Р., Соловьева В.П. Тканевая терапия и тканевые препараты.– М.: Медэкспорт, 1986.– 71 с.

10. Лотош Т.Д., Соколова Б.Н., Абрамова А.Б. и др. Оценка биологической активности комплекса гуминовых кислот торфа//Гуминовые удобрения – теория и практика их применения.– Днепропетровск, 1980.
11. Соколова Б.Н., Егорова В.Т. Биологическая активность комплекса микроэлементов морской воды на антитоксических тестах//Респ. науч. конф. «Применение тканевых препаратов в медицине»: Тез. докл.– Одесса, 1983.– Т.1.– С. 20–21.
12. Соловьева В.П. Влияние тканевых препаратов по В.П.Филатову на повышение защитных систем организма: Автореф. дисс. ... д-ра мед. наук.– Одесса, 1972.
13. Соловьева В.П., Лотош Т.Д. Фармако-физиологические тесты для оценки препаратов торфа//Тез. докл. междунар. симпоз.– Брно, 1979.– Т.7.– С. 403–407.
14. Соловьева В.П., Сотникова Е.П., Соколова Б.Н. и др. К вопросу фармакологической характеристики комплекса гуминовых кислот торфа//Гуминовые удобрения – теория и практика их применения.– Днепропетровск, 1980.– Т.7.– С. 115–117.
15. Соловьева В.П., Лотош Т.Д., Наумова Г.В. и др. Биологическая активность лечебного препарата из торфа – «Торфота»//Новые процессы и продукты переработки торфа.– Минск: Наука и техника, 1988.– С. 109.
16. Соловьева В.П., Сотникова Е.П., Иванов В.И. Биогенные препараты в геронтологии и гериатрии//Всесоюзн. симпоз. «Гериатрические средства: эксперим. поиск, клин. использ.»: Тез. докл.– К., 1990.– С. 76–78.
17. Соловьева В.П., Сотникова Е.П., Лотош Т.Д. Рекомендации по биологической стандартизации комплексных препаратов биогенного происхождения//Перспективы создания и производства лек. средств в Украине.– Харьков, 1993.– С. 283–285.
18. Соловьева В.П., Сотникова Е.П., Лотош Т.Д., Абрамова А.Б. Современная разработка препаратов по В.П.Филатову в Украине//I Нац. съезд фармакологов Украины «Современные проблемы фармакологии»: Тез. докл.– Полтава, 1995.– С. 158.
19. Сотникова Е.П. Фармакологическая характеристика адаптогенного действия новых биогенных препаратов: Автореф. дисс. ... д-ра мед. наук.– К., 1989.
20. Сотникова Е.П., Иванов В.И., Соколова Б.Н. Антитоксические свойства летучих фракций торфа//Тр. VIII Междунар. конгр. по торфу.– Ленинград, 1988. – С. 65–69.
21. Сотникова Е.П., Соловьева В.П., Лотош Т.Д. Экспериментальная оценка уровня биологической активности и безопасности адаптогенов//Актуальные проблемы клинической фармакологии.– Винница, 1998.– С. 256–257.
22. Тканевая терапия. Экспериментальные основы/Под ред. Н.А.Пучковской.– К., 1975.– С. 11–47.
23. Храбустовский И.Ф. и др. Методические рекомендации по определению естественной резистентности животных в условиях интенсивного их использования//Тр. НИИЗВ.– Харьков, 1974.
24. Шандра А.А., Годлевский Л.С., Семенюк Н.Д. Формирование генерализованной судорожной активности у мышей при ежедневном введении коразола в подпороговых дозах//Бюлл. эксперим. биол. и мед.– 1983.– №4.– С. 20–22.

## МОДЕЛЮВАННЯ ЕНДОТОКСИЧНОГО ТА СЕПТИЧНОГО ШОКУ У ГРИЗУНІВ

Хромов О.С.,  
Соловійов А.І.,  
Стефанов О.В.

### Перелік скорочень

**Et** – ендотоксин  
**ЗПО** – загальний периферичний опір  
**ІС** – індекс скоротливості  
**LD<sub>50</sub>** – середня смертельна доза  
**ЛПС** – ліпополісахарид  
**САТ** – середній артеріальний тиск  
**Сеп** – сепсис  
**СШ** – септичний шок  
**t** – температура  
**ФНП** – фактор некрозу пухлини  
**ХОК** – хвилинний об'єм крові

### Вступ

Незважаючи на поліпшення методів діагностики і появу нових терапевтичних засобів, сепсис у більшості хірургічних відділень інтенсивної терапії залишається однією із серйозних причин смертності [1]. Наприклад, більшість хворих після тяжкої травми чи трансплантації наражаються на значний ризик розвитку сепсису внаслідок проведення імунодепресантної терапії і частого використання внутрішньовенних катетерів для різних парентеральних введень.

Протягом останнього десятиріччя сепсис і пов'язані з ним розлади були вивчені у низці досліджень, завдяки чому стало можливим розкриття багатьох механізмів розвитку септичного процесу. Однак проведення великомасштабних клінічних досліджень ускладнено внаслідок значних міжіндивідуальних розбіжностей у способах лікування, віці хворих і можливих супутніх захворюваннях [2]. Крім того, перед проведенням клінічних досліджень для оцінки ефективності нових лікарських засобів необхідно виконати багато попередніх експериментів. Тому прогрес у розробці і вивченні нових препаратів в значній мірі залежить від досліджень, проведених на тваринах з клінічно адекватною моделлю певної патології. Розроблено численні моделі ендотоксемії та бактеріємії, що відтворюються на великих тваринах, наприклад, вівцях, собаках, свинях і приматах [3–6]. У цій роботі на підставі аналізу літературних і власних даних описуються деякі найбільш розповсюджені моделі ендотоксичного та септичного шоку у гризунів. Використання гризунів в експерименті має багато переваг, оскільки ці тварини відносно недорогі, доступні, можуть бути генетично ідентичними, мати однакову стать і порівняльний вік, знаходиться на тому ж самому харчовому раціоні і не бути носіями специфічних патогенів. Таким чином, шляхом використання відповідної кількості тварин для статистичної оцінки результатів можна звести до мінімуму вплив біологічних змінних факторів.

Для терміна «сепсис» (Сеп), як і раніше, залишається актуальною значна невідповідність його визначення в експериментальних дослідженнях з використанням моделей на тваринах і в

клінічних дослідженнях, оскільки в різних роботах під цим терміном розуміють різні патологічні стани. В 1980 р. Wichertman із співавт. дали визначення Сеп, як гострої інфекції, при якій у тварини внаслідок вторгнення інфекції розвиваються реакції ендогенної токсичності (підвищення температури, слабкість, анорексія, летаргія і т.д.), а септичний шок (СШ) виникає лише тоді, коли прояви сепсису призводять до циркуляторного колапсу [7]. У деяких роботах відзначалося, що у померлих хворих із симптомами Сеп і органної недостатності не вдавалося висіяти культуру з крові і виявити ознаки інфекції при розтині [8]. Це може пояснюватись швидким виведенням живих бактерій із крові, що було продемонстровано G.Schlag et al. [9] на приматах з моделлю Сеп, викликаного живою кишковою паличкою. Пізніше R.C.Bone [10] запропонував називати сепсисом «клінічну ознаку інфекції плюс системну реакцію на неї (тахіпное, тахікардія й гіпер- чи гіпотермія)». Після виявлення зв'язку грибкових і вірусних інфекцій із клінічними ознаками та симптомами Сеп [11] M.P.Fink і S.O.Heard у 1990 р. запропонували розглядати сепсис, як сукупність клінічних і лабораторних ознак, що вказують на розвиток генералізованої запальної реакції (підвищена температура, тахікардія, тахіпное, низький системний судинний опір, лейкоцитоз, тромбоцитопенія, зміна розумового статусу), яку не можна пояснити іншими станами, і яка супроводжується гострою системною дисфункцією органів і часто пов'язана з наявністю тяжкої бактеріальної, грибкової чи вірусної інфекції [12].

R.L.Danner et al. [13] підтвердили важливу роль ендотоксину (Ет) у клінічному прояві СШ. Вони виявили Ет у плазмі крові 44% хворих, які перебували у критичному стані. Подібно до цього, A.O.Aasen et al. відмітили, що органна легенева недостатність частіше зустрічається у хворих з наявністю ендотоксину в плазмі крові [14]. Смертність хворих з підтвердженим Сеп і позитивним ендотоксиновим тестом значно вища. Разом з тим, досить часто ендотоксиновий тест у таких хворих буває негативним [15]. Це можна пояснити занадто швидким виведенням Ет з крові. На собаках було показано, що протягом 5 хвилин після внутрішньовенного введення виводиться 98,9% – 99,9% від введеної дози Ет [16]. В експериментах на свинях при тривалій інфузії ендотоксину було виявлено, що через 3 години максимальна концентрація ліпополісахариду (ЛПС) становить всього лише 0,05% від очікуваної величини [17]. Під ендотоксемією у даному випадку розуміють стан, викликаний введенням тварині низької чи високої дози Ет, а ендотоксичний шок розвивається, коли ендотоксемія призводить до циркуляторного колапсу.

Крім того, СШ може бути пов'язаний з токсичним станом, викликаним стимуляцією моноцитів чи бактерійних токсинів, що вивільнюються у кров із загиблих бактерій, або небактерійними запальними реакціями. Наступне вивільнення цитокінів з моноцитів спричинює активацію різних каскадів реакцій, що викликає порушення функцій одного чи багатьох органів, а потім і загинь організму (Рис. 1).

**Вибір виду тварин**

Вибір виду тварин для моделювання патології залежить від багатьох факторів. Крім стандартних вимог, таких як захист прав тварин, доступність тварин, кваліфікація спів-

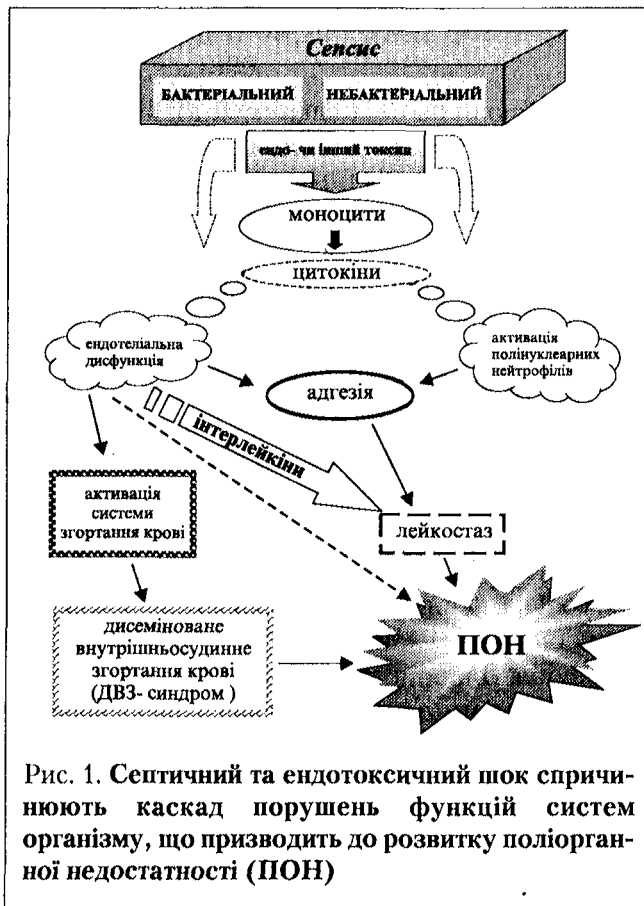


Рис. 1. Септичний та ендотоксичний шок спричинюють каскад порушень функцій систем організму, що призводить до розвитку поліорганної недостатності (ПОН)



робітників лабораторії, найважливішим аспектом є мета дослідження. Відносно просте утримання невеликих тварин, наприклад, мишей, щурів і мурчаків, обумовлює їхній вибір як найбільш бажаних для багатьох видів досліджень, особливо коли необхідна велика кількість тварин. Миші [18], щури [19] і мурчаки [20] широко використовуються для порівняльних досліджень, основним індикативним параметром яких є смертність. Застосування спеціального обладнання дозволяє оцінити гемодинамічні параметри, наприклад, серцевий викид, артеріальний тиск і/чи тиск у легеневій артерії щурів [21] або мурчаків [22]. Крім того, щурів і мурчаків можна використовувати для експериментів *ex vivo* з ізольованими органами, наприклад, з ізольованими перфузованими легенями, печінкою чи препаратом Лангендорфа, який використовують для оцінки функції серця. Крім того, виведені спеціальні лінії мишей і щурів з особливими властивостями, наприклад, резистентні до ендотоксину миші (лінія CH3/HeN) [23]. Недоліком дрібних лабораторних тварин, крім високої їхньої резистентності до мікробних агентів, є невеликий об'єм крові, що не дозволяє брати значну кількість крові для аналізів. За даними літератури, серед гризунів найчастіше використовуються кролі завдяки їх більш високій, ніж у мишей чи щурів, чутливості до ендотоксину. Крім того, вони мають більший об'єм крові, що полегшує проведення інструментальних досліджень і дозволяє брати декілька проб крові у тієї ж самої тварини в ході експерименту.

### Вибір моделей

Вибір моделі залежить від мети експерименту. Так, якщо дослідник хоче вивчити клітинні та субклітинні зміни під час шоку, може бути виправданим застосування моделі ендотоксичного, бактеріального чи септичного шоку. І навпаки, якщо необхідно перевірити зміни при гіпердинамічних циркуляторних станах, можна використовувати моделі, що відтворюють тільки цей стан. Однак, якщо поставлена мета простежити зміни кровообігу від гіпердинамічного до гіподинамічного в тієї самої тварини, то вибір моделі дещо обмежений.

### Порівняння моделі септичного та ендотоксичного шоку

Незважаючи на схожість сепсису та ендотоксемії, співставлення даних, отриманих в експериментах із введенням ендотоксину й моделлю сепсису, ускладнено через розходження цілого ряду параметрів (табл. 1) [24]. Тому клінічна релевантність септичного та, особливо, ендотоксичного шоку у тварин залежить від можливості адекватного відтворення клінічної картини, що є метою відповідного експерименту. Деякими перевагами моделі ендотоксичного шоку, у порівнянні з моделлю сепсису, є відносна простота у роботі з ендотоксином, зокрема, можливість збереження й приготування стабільного розчину перед введенням, просте кількісне порівняння з контрольною групою та зручна стандартизація ендотоксинового навантаження. При моделюванні сепсису використовуються живі мікроорганізми, що ускладнює відтворення септичного навантаження.

### Ендотоксинові моделі

У літературі описані два різних типи моделей ендотоксичного шоку у гризунів: моделі із сенсibiliзацією (переважно на мишах), при яких вводиться декілька мікрограм, і моделі без сенсibiliзації з введенням декількох міліграм ЛПС на кг маси тіла (рис. 2). Через дві години після

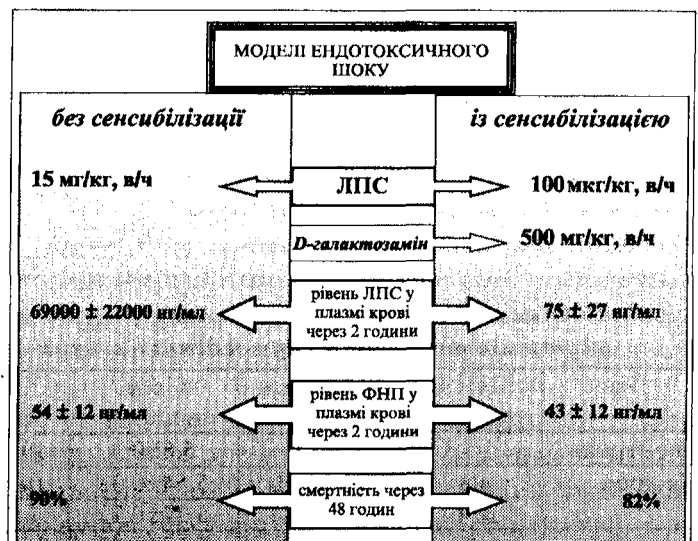


Рис. 2. Способи моделювання ендотоксичного шоку у щурів (ЛПС – ліпополісахарид; ФНП – фактор некрозу пухлини)

Розбіжності між септичним та ендотоксичним шоком

Показники	Септичний шок		Ендотоксичний шок	
	Зміни	Джерело	Зміни	Джерело
Серцевий викид	підвищений	1	дещо знижений	21, 26
Опір судин	знижений	62	підвищений або знижений	28
Глюконеогенез	дещо підвищений	63	знижений	61
Рівень глюкози у крові	значно підвищений	63	значно знижений	61
Рівень ЛПС у крові	підвищений чи знижений	15	значно підвищений	35

введення максимальна концентрація Ет в плазмі крові несенсибілізованих тварин у 1000 разів вища, ніж в плазмі крові сенсибілізованих тварин. Смертність тварин протягом 48 год після введення цих доз ендотоксину приблизно однакова. Вибір умов експерименту, (доза, способу введення та його тривалості) залежить від поставленої мети. Тривалий період спостереження є необхідним у тих випадках, коли найбільший інтерес представляє такий параметр, як виживання, оскільки при проведенні фармакологічних досліджень недостатній період спостереження не дозволяє точно оцінити смертність [25].

**Моделі гострої ендотоксемії**

**Моделі без сенсибілізації** (табл. 2, рис. 3, 4)

Виразність і перебіг викликаного ЛПС шоку залежать від таких змінних величин, як доза, шлях введення і тривалість ендотоксिनного навантаження.

*Залежність відповідної реакції від дози.* Введення високої дози ендотоксину кролям (5 мг/кг) супроводжується зниженням серцевого викиду та підвищенням системного судинного опору [26]. На відміну від цього, низькі дози ЛПС (1–3 мкг/кг) приводять до появи гіпердинамічного стану, який відповідає компенсованому сепсису у людини [27]. Подібні результати були отримані також і у щурів [21, 28].

Модель викликаного ендотоксином шоку та летальність залежать від дози ЛПС і легко стандартизуються.

*Залежність відповідної реакції від швидкості введення.* Перебіг шоку,



Рис. 3. Вплив дози, швидкості та способу введення ендотоксину на виживання тварин протягом 48 годин

Таблиця 2

**Зміни деяких показників метаболізму у щурів при тривалому внутрішньовенному та внутрішньочеревинному введенні низьких доз (2,66 мг/кг/доба) ендотоксину**

Час	Шлях введення	Зміни маси тіла, г	Білок, г/100 мл	Глюкоза, мг/100 мл	Білірубін, мг/100 мл	Креатинін, мкмоль/л
контроль	—	—	5,6±0,3	191,0±19,0	0,02±0,01	30,00±4,00
1-а доба	в/в	-26,5±1,0	5,54±0,33	147,5±15,8	0,14±0,02	67,25±9,18
	в/ч	-21,5±2,4	5,97±0,23	140,0±6,0	0,15±0,04	62,00±5,15
4-а доба	в/в	1,0±6,3	5,16±0,33	154,0±30,2	0,14±0,13	51,50±6,18
	в/ч	0,0±1,0	5,22±0,13	134,3±18,1	0,15±0,08	45,00±4,95
6-а доба	в/в	8,0±2,8	5,40±0,21	175,9±28,3	0,16±0,08	44,50±6,65
	в/ч	13,7±4,4	5,13±0,09	197,3±47,4	0,10±0,02	49,00±4,76

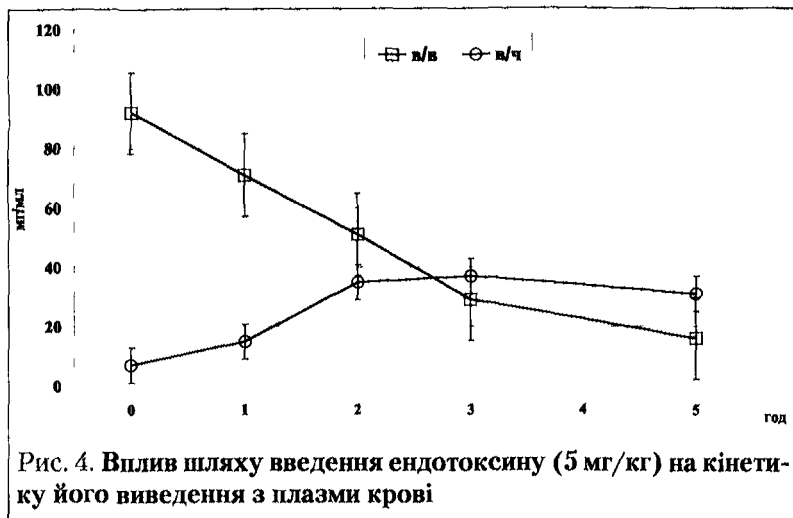


Рис. 4. Вплив шляху введення ендотоксину (5 мг/кг) на кінетику його виведення з плазми крові

через 3–4 години. Таке розходження може бути пов'язане з розвитком легеневої вазоконстрикції [29, 30].

Оскільки ендотоксини у більшості септичних хворих, очевидно, постійно виділяються у кровотік, експериментальних тварин необхідно піддавати тривалому ендотоксиновому навантаженню, використовуючи імплантований осмотичний насос.

*Залежність відповідної реакції від шляху введення.* При порівнянні внутрішньовенного (в/в) і внутрішньочеревинного (в/ч) шляхів введення ЛПС виявляються розбіжності у концентрації Ет в плазмі. При в/в ін'єкції щурам тієї ж дози ендотоксину спостерігається початковий високий рівень його в плазмі, який поступово протягом 2 год знижується до рівня, який зареєстрований при його в/ч введенні. У подальшому динаміка вмісту Ет в плазмі суттєво не відрізняється від такої при в/ч введенні [31].

Таким чином, тривале внутрішньочеревинне введення, скоріше за все, більш наближено до динаміки вивільнення ендотоксину, яка відбувається у хворих із септичним шоком.

### Моделі із сенсibilізацією

Встановлено, що летальний результат, викликаний Ет грамнегативних бактерій, завжди виникає в стані гіперсенсibilізації, який розвивається у носія інфекції. При застосуванні різних експериментальних моделей летальний ефект Ет у тварин можна підсилювати шляхом сенсibilізації останніх D-галактозаміном, мураміддипептидом, введенням живих грамнегативних бактерій, попередньою сенсibilізацією за допомогою низьких (нелетальних) доз Ет.

*Модель із сенсibilізацією D-галактозаміном.* Введення тваринам D-галактозаміну спричинює розвиток сенсibilізації до летальної дії Ет. Експерименти з ендотоксином і галактозаміном проводилися, в основному, на мишах [32]. Вважається, що D-галактозамін, викликаючи зміни в гепатоцитах, призводить до розвитку в печінці сенсibilізації до ЛПС, робить організм хазяїна більш чутливим до летальної дії токсичних продуктів макрофагів, особливо до фактора некрозу пухлини (ФНП) [33]. Галактозамін також викликає сенсibilізацію до безпосереднього введення ФНП. G. Feuerstein et al. (1990) вказують на наявність кореляції між утворенням ФНП і концентрацією ЛПС у межах до 100 мкг/кг маси тіла, при якій досягається постійний рівень ЛПС у плазмі крові [34]. Ін'єкція одного ЛПС у дозі 100 мкг/кг маси тіла не викликала загибелі несенсibilізованих щурів, однак призводила до 82% летальності сенсibilізованих щурів, яка спостерігалась протягом 48 год, порівняно з 90% летальністю несенсibilізованих щурів, яким вводили по 15 мг/кг. Це, очевидно, пов'язано з підвищенням сенсibilізації печінки до токсичності ФНП, оскільки попереднє введення тваринам моноклональних антитіл проти ФНП призводило до 100% виживання сенсibilізованих D-галактозаміном щурів [35].

*Модель із сенсibilізацією мураміддипептидом.* При введенні 100 мкг мураміддипептиду мишам спостерігалось підвищення чутливості до наступного введення ендотоксину [36]. Введення високої дози Ет (50–100 мкг), яка викликає загибель тварин у період від кількох хвилин до 1 год, спричиняло розвиток ранньої фази гіперреактивності, а при низькій дозі (1–5 мкг) відзначалася пізня фаза токсичності (через 15–72 години). Рання та пізня фази токсичності у тварин, яким після Ет вводили мураміддипептид, розглядалися як виразні прояви токсичності, спричинені різними механізмами. Рання фаза токсичності (подібна до анафілактичних проявів) виникає при введенні лише деяких S-форм препаратів ЛПС і виявляється навіть у резистентної до Ет лінії мишей СНЗН/HeJ. У той же час пізня фаза є проявом підвищеної чутливості до летального ефекту ліпиду-A і не залежить від типу використовуваного ЛПС і відсутня у резистентної до Ет лінії мишей [37].

*Сенсibilізація свинцем.* Свинець підвищує сенсibilізацію тварин до Ет. Відзначалося, що введення нелетальної дози свинцю й Ет щурам [38] чи мишам [39] призводило до розвитку гіперреактивності і загибелі тварин. Показано також, що свинець підвищує чутливість до ФНП – важливого медіатора токсичності Ет [39]. Це вказує на те, що свинець і D-галактозамін є генотоксичними агентами, здатними чинити подібну дію.

*Сенсibilізація пухлиною, що росте.* У мишей з деякими видами пухлин відзначалася підвищена чутливість до Ет [40]. Показано, що сенсibilізацію здатні викликати, як мінімум, дві пухлини – метастазуюча карцинома легень Льюїса з внутрішньом'язовим проростанням у мишей лінії С57/В1/6 і саркома ЕМТ6, що проростає підшкірно у мишей лінії BALB/С. Підвищення реактивності до Ет відзначалося вже на 3-ю добу після інокуляції пухлини з наступним посиленням реактивності з максимумом на 15-у добу. Сенсibilізація до Ет, викликана пухлиною, очевидно, у першу чергу, пов'язана з особливими властивостями пухлини і не залежить від хазяїна.

*Сенсibilізація інфекцією, викликаною грамнегативними бактеріями.* Індукція гіперреактивності до Ет була продемонстрована в експериментальних тварин для різних видів патогенних мікроорганізмів і тому може бути загальною властивістю, щонайменше, для патогенних грамнегативних бактерій. Підвищення чутливості до летальної дії ендотоксину було виявлено у мишей, яким вводили живі чи убиті бактерії *Coxiella burnetii* [41]. Виявлено тривалу сенсibilізацію (кілька місяців), яка супроводжувалася вираженою гепатоспленомегалією. С.Galanos et al. (1988) описали модель із сенсibilізацією за допомогою *Salmonella typhimurium* ( $2 \cdot 10^4$  клітин) у мишей лінії СНЗ/Тіf, при якій максимальний сенсibilізуючий ефект визначався на 5–6-у добу ( $LD_{50}$  для ЛПС становила 1 мкг/г, тоді як для звичайних мишей вона дорівнює 15 мкг/г) [37].

### Моделі хронічної ендотоксемії

Р.Е.Fish і J.А.Spitzer (1984), намагаючись розробити модель гіпердинамічного стану клінічного сепсису, вводили щурам Ет шляхом тривалої в/в інфузії за допомогою осмотичного насосу Альцета зі швидкістю 3 мг/кг/доб [42]. Отримані ними результати свідчать про те, що у тварин, яким тривало вводять таку низьку дозу Ет, розвивається більшість порушень, характерних для хворих із гіпердинамічним сепсисом. У цих тварин відзначаються транзиторна гіперлактатемія, прогресивний лейкоцитоз, падіння гематокриту, підвищення споживання кисню та відносна гіпертермія. Крім того, при цій моделі підтримується коронарний кровообіг [42], але робота міокарда порушується [43]. Разом з тим, при цій моделі не розвиваються тахікардія, гіперінсулінемія чи гіперглікемія, характерні для хворих на ранній стадії сепсису.

Р.Е.Fish et al. (1986), вимірюючи регіональний кровотік під час тривалої інфузії низької дози ендотоксину, виявили, що протягом 6 чи 30 год після введення ендотоксину серцевий викид залишається без змін [44]. При цьому кровотік у v. portae значно падає вже через 6 годин після початку введення ендотоксину. Однак, у хворих із сепсисом реєструється збільшення

кровотоку у печінці [45, 46], що суперечить даним, отриманим на щурах, яким тривало вводили низьку дозу ендотоксину [43].

H.Arita et al. (1988) показали, що при інфузії Et у v. portae мурчаків може розвиватися гіперметаболізм [47]. Ці дослідники також визначили, що при в/ч введенні ендотоксину швидкість метаболізму в стані спокою залишається незмінною. Однак при цьому залишається неясним, чи розвивається у тварин гіпометаболізм при тривалій інфузії ендотоксину.

#### **Внутрішньовенне та внутрішньочеревинне інфузійне введення живих мікроорганізмів**

Для вивчення дії різних терапевтичних засобів за умов септичного шоку більшість дослідників використовували внутрішньовенне введення живої кишкової палички [7, 48, 49]. Однак дана модель не дозволяє точно відтворити стан, притаманний людині, оскільки при болюсній інфузії кишкової палички, синьогнійної палички і т.п. хазяїн піддається надмірному бактеріальному навантаженню, що не дозволяє повністю проявитися його захисним механізмам. У реальній ситуації на практиці більшість хворих одномоментно не піддаються такому масивному бактеріальному навантаженню, оскільки в них існує приховане септичне вогнище зі стійкою, хоча й з перервами, вираженою бактеріальною інтервенцією.

M.J.Durkot і R.R.Wolfe (1989) вводили шляхом інфузії  $10^{10}$  живих кишкових паличок здоровим ненаркотизованим мурчакам і виявили, що, залежно від шляху введення, це може призводити як до гіпер-, так і гіподинамічного стану кровообігу [50]. Наприклад, внутрішньовенна інфузія  $10^{10}$  живих кишкових паличок викликає гіподинамічний стан, тоді як підшкірна ін'єкція цих же бактерій призводить до розвитку гіпердинамічного стану. Проте, в обох випадках відзначається зниження концентрації інсуліну. Незважаючи на те, що такі моделі здатні викликати шок, у них відсутня можливість сформувати у хазяїна септичне вогнище, особливо якщо інфікування здійснюється в/в шляхом. Попри це, такі моделі із застосуванням в/в чи в/ч введення можуть бути корисними для вивчення кінетики бактеріального кліренсу (очищення крові від бактерій).

L.J.Pass et al. (1984) моделювали септичний процес за допомогою безперервної в/в інфузії бактерій наркотизованим щурам протягом 5 годин. При цьому вони встановили, що спочатку серцевий викид не змінювався, а потім, через 3–4 год, відбувалось його значне зниження [51]. Інша група дослідників замість повільної безперервної інфузії проводила болюсну (швидку) інфузію живих кишкових паличок наркотизованим щурам, що призводило до розвитку двофазної реакції – значному підвищенню серцевого викиду, що триває біля 90 хвилин, з наступною його нормалізацією [52]. H.M.Cryer et al. (1987) розробили модель внутрішньовенної інфузії кишкової палички ( $3 \cdot 10^9$ /кг протягом 5 хв), яка викликала у щурів гіпердинамічний стан кровообігу тривалістю 2 год після введення [53]. Крім того, вони з успіхом застосували цю модель для ефективного вивчення впливу гіпердинамічного сепсису на мікроциркуляцію у деяких органах і тканинах [54]. Важливо відзначити, що у моделі, розробленій H.M.Cryer et al. [53], виключення функцій ЦНС у щурів викликалось не шляхом загальної анестезії, а преколатеральним пересіканням стовбура головного мозку. Більшість описаних вище моделей може бути також використана для одержання інформації відносно кінетики очищення крові від бактерій, реакції лейкоцитів, а також температурної реакції при різних значеннях часу та дози.

H.K.Sleeman et al. (1969) та I.Perkash et al. (1970) описали модель у щурів, при якій, за їх твердженням, розвиток сепсису викликається введенням чистої бактеріальної культури у черевну порожнину [55, 56]. Однак M.K.Browne та G.V.Leslie (1976) не вдалося змоделювати значну смертність шляхом введення чистої бактеріальної культури у черевну порожнину щурів [57]. G.A.G.Decker et al. (1971) застосовували в/ч введення *Klebsiella pneumoniae*, змішаної з суспензією слизу, що дозволило їм викликати важкий генералізований перитоніт. Суспензія слизу використовувалася з метою гальмування активності макрофагів у щурів, що дозволило одержати модель генералізованого перитоніту у цих тварин [58]. Цю ж модель застосовували M.K.Browne та G.V.Leslie у мишей при використанні великої кількості грамнегативних аеробних і анаеробних бактерій [57].

D.H.Ahrenholz і R.L.Simmons (1980) застосовували модель з в/ч введенням щурам  $2 \cdot 10^8$  кишкових паличок, суспендованих в слині [59]. Це викликало 100% смертність тварин протягом доби. Однак, коли таку ж кількість бактерій вводили в/ч разом зі згустком фібрину бичачої крові, у щурів розвивався абсцес, що запобігало ранній загибелі тварин, хоча смертність на протязі 10 діб залишалася на рівні 90%. Фібрин може обмежувати локальне накопичення мікробів з утворенням септичного вогнища і тому затримувати системну абсорбцію захоплених бактерій. За допомогою цієї моделі можна вивчати кінетику системної бактеріальної абсорбції. Крім того, вона дозволяє визначити, наскільки схожа кінетика системної бактеріальної абсорбції для різних мікроорганізмів.

У дослідженнях T.Nau та R.L.Simmons (1977) було показано, що введення чистої бактеріальної культури у поєднанні з ад'ювантом у черевну порожнину щурів призводить до загибелі тварин не пізніше, ніж через 12 годин. Ці автори стверджують, що дана модель з введенням чистої культури бактерій разом з ад'ювантом є моделлю не перитоніту, а ендотоксичного шоку [60].

H.R.Alexander et al. (1991) використовували модель з в/ч імплантацією мурчакам осмотичних мінінасосів Альцета, у які були вміщені життєздатні кишкові палички та золотисті стафілококи [61]. Така модель дозволила одержати 100% смертність, яку при цьому можна знизити майже до 50% шляхом відповідного коригування дози та виду бактерій. Основною перевагою цієї моделі є відстрочена загибель тварин (на 18-у добу), якій часто передують розвиток пневмонії. Завдяки тому ця модель може бути досить корисною для вивчення особливостей хронічного сепсису у людей.

Слід відзначити, що всі викладені вище (крім останнього) способи відтворення експериментального СШ суттєво відрізняються від реальної клінічної практики. В першу чергу це стосується бактеріальних агентів. У клініці причиною розвитку СШ є асоціації мікроорганізмів, а не монокультура та, як правило, це комбінована грампозитивна й грамнегативна флора.

На наш погляд, використання тільки монокультури мікроорганізмів або тільки мікробних токсинів не дозволяє вірно оцінити порушення кровообігу на організменному рівні. В той же час, навіть використання асоціації різних бактерій не призводить до відтворення адекватного клінічного перебігу патологічного процесу. Як правило, це пов'язано з різною патогенністю та вірулентністю одних і тих же мікроорганізмів одного виду, отриманих із різних джерел. Багаторічний досвід моделювання септичного шоку привів нас до розуміння того, що для відтворення даної патології слід використовувати комбінацію як грампозитивних, так і грамнегативних мікроорганізмів, бажано їх музейні штами. Відома також мінливість властивостей мікробів залежно від географічного району їх проживання. Тому у кожному конкретному випадку при моделюванні септичного шоку на тваринах слід використовувати мікроорганізми, одержані від хворих на сепсис і септичний шок, що проживають в даній місцевості. Дозу мікроорганізмів, що вводяться, неможливо встановити заздалегідь, в середньому вона складає  $10^8$  –  $10^{11}$  мікробних тіл добової культури кожного виду на 1 кг маси тіла тварини при в/ч введенні. Остаточний вибір доз мікроорганізмів для моделювання СШ обумовлюється періодом часу, відтворенням патологічного процесу та контролюється за динамікою температури тіла і артеріального тиску. Так, наприклад, нам вдалося відтворити септичний шок, вводючи білим щурам-самцям лінії Вістар суміш добових культур *Staphylococcus aureus* і *V. paratyphosus* по  $1 \cdot 10^9$  мікробних тіл кожного виду на 100 г маси тіла. В/ч введення щурам змішаної культури мікроорганізмів у цій дозі супроводжувалося суттєвими змінами системного кровообігу та скоротливої активності серця (табл. 3).

*Зміни показників гемодинаміки та температури у щурів при внутрішньочеревинному введенні змішаної культури*

Показ.	Стат. показ	Вих. зн.	Час, хв				
			60	120	180	240	270
САТ, мм рт.ст.	M±m	110,6±9,3	105,1±5,2	92,4±6,8	65,5±6,4	58,6±5,2	39,1±4,1
	P		>0,05	>0,05	<0,01	<0,01	<0,001
ХОК, мл/хв	M±m	70,0±6,8	66,6±5,6	69,4±7,0	68,9±6,9	42,8±4,4	23,4±2,5
	P		>0,05	>0,05	>0,05	<0,05	<0,001
ЗПО, м·Н·с·м <sup>-4</sup>	M±m	126,4±12,9	126,2±11,4	106,5±10,7	76,1±7,5	109,5±11,0	134,1±13,1
	P		>0,05	>0,05	<0,05	>0,05	>0,05
ІС, с <sup>-1</sup>	M±m	70,2±8,6	64,7±1,8	57,9±5,7	46,1±3,4	41,0±5,6	32,4±3,5
	P		>0,05	>0,05	>0,05	<0,05	<0,01
t, °С	M±m	34,2±0,5	32,8±0,7	32,3±0,8	31,5±0,9	32,1±0,9	33,5±0,8
	P		>0,05	<0,05	<0,05	<0,05	>0,05

### Висновок

Розроблені моделі сепсису та септичного шоку, котрі передбачують введення ендотоксину (повільне чи безперервне болюсне введення ендотоксину), підшкірне чи в/ч введення бактерій з ад'ювантами або без них, а також в/ч зараження фекальним матеріалом. Деякі такі моделі можуть застосовуватися для вивчення гіперметаболічної фази сепсису, тоді як інші моделі корисні для вивчення гіпометаболічного та гіподинамічного циркуляторного стану сепсису. Кожна модель може надати корисну інформацію для подальшого розуміння патофізіології ендотоксемії, сепсису та септичного шоку. Надзвичайно цінною для вивчення та з'ясування механізмів, що беруть участь у розвитку клінічного сепсису, є модель, котра дозволяє прослідкувати зміни від гіпердинамічного до гіподинамічного стану кровообігу.

Таким чином, резюмуючи вищевикладене, можна зробити такі висновки:

- вибір конкретного способу моделювання септичного шоку у гризунів залежить від задачі розпочатого дослідження. Наприклад, для оцінки протишокової (гемодинамічної) дії лікарського засобу перевагу слід віддавати моделям, в котрих використовується однократне внутрішньовенне введення ендотоксину чи в/ч введення змішаної живої культури. Для оцінки впливу препарату, який вивчається, на виживання тварин доцільно використовувати або тривале введення ЛПС, або внутрішньовенне введення живих мікроорганізмів;

- при моделюванні патологічного процесу необхідно брати до уваги характерні для гризунів сезонні та місцеві геокліматичні розбіжності реактивності. У зв'язку з цим дози живих мікроорганізмів, що забезпечують розвиток того чи іншого визначеного ефекту, в різні сезони будуть відрізнятися. Це потребує підбору необхідної дози;

- критеріями оцінки ефективності досліджуваних потенційних лікарських засобів і препаратів порівняння можуть бути достовірне збільшення виживання дослідних тварин, здатність препарату попереджувати зниження систолічного артеріального тиску нижче 50–60 мм рт.ст. або ж відновлювати та тривало підтримувати його на вказаному рівні чи вище нього.

**Література**

1. Parker M.M, Parrillo J.E. Septic shock: hemodynamics and pathogenesis//JAMA.– 1983.– V.250.– P. 3324–3327.
2. A controlled clinical trial of high-dose methylprednisolone in the treatment of severe sepsis and septic shock/Bone R.C., Fisher C.J., Clemmer T.P. et al.//N. Engl. J. Med.– 1987.– V.317.– P. 653–658.
3. Peripheral lymph flow in sheep with bacterial peritonitis: evidence for increased peripheral microvascular permeability accompanying systemic sepsis/ Avila A., Warshawski F., Sibbald W. et al.//Surgery.– 1985.– V.97.– P. 685–695.
4. Brigham K.L., Woolverton W.C., Blake L.H., Staub N.C. Increased sheep lung vascular permeability caused by Pseudomonas bacteremia//J. Clin. Invest.– 1974.– V.54.– P. 792–804.
5. Gnidec A.G., Sibbald W.J., Cheung H., Meiz C.A. Ibuprofen reduces the progression of permeability edema in an animal model of hyperdynamic sepsis//J. Appl. Physiol.– 1988.– V.65.– P. 1024–1032.
6. Hussian S., Roussos C. Distribution of respiratory muscle and organ blood flow during endotoxic shock in dogs//Appl. Physiol.– 1985.– V.59.– P. 1802–1808.
7. Wichierman K.A., Baue A.E., Chaudry I.H. Sepsis and septic shock – a review of laboratory models and a proposal//J. Surg. Res.– 1980.– V.29.– P. 189–201.
8. Marshall J.C., Christou N.V., Horn R., Meakins J.L. The microbiology of multiple organ failure: the proximal gastrointestinal tract as an occult reservoir of pathogens//Arch. Surg.– 1988.– V.123.– P. 309–315.
9. A subchronic model of live bacteria sepsis in baboons/Schlag G., Davies J., Redl H. et al.//Circ. Shock.– 1991.– V.34.– P. 61.
10. Bone R.C. Let's agree on terminology: definitions of sepsis//Crit. Care Med.– 1991.– V.19.– P. 973–976.
11. Physiology and metabolism in isolated viral septicemia: further evidence of an hostdependent response/Deutschman C.S., Konstantinides F.N., Tsau M. et al.//Arch. Surg.– 1987.– V.122.– P. 21–25.
12. Fink M.P., Heard S.O. Laboratory models of sepsis and septic shock//J. Surg. Res.– 1990.– V.49.– P. 1–11.
13. Endotoxemia in human septic shock/Danner R.L., Elin R.J., Reilly J.M. et al.//Crit. Care Med.– 1988.– V.16.– P. 397.
14. Aasen A.O., Rishovd A.L., Stadaas J.O. Role of endotoxin and proteases in multiple organ failure//Prog. Clin. Biol. Res.– 1989.– V.308.– P. 305–314.
15. Elin R.J., Robinson R.A., Levine A.S., Wolff S.M. Lack of clinical usefulness of the limulus test and the diagnosis of endotoxemia//N. Engl. J. Med.– 1975.– V.292.– P. 521–524.
16. Nakao A., Shimohara M. Changes of circulating blood endotoxin analyzed by quantitative assay after intravenous administration endotoxin//Jpn. J. Gastroenterol.– 1985.– V.82.– P. 296–300.
17. Aasen A.O., Ruud T.E., Pillgram-Larsen J., Stadaas J.O. Multi-therapy: a new treatment regimen in endotoxemia//Prog. Clin. Biol. Res.– 1987.– V.236A.– P. 211–225.
18. Hagman W., Denzlinger C., Keppler D. Role of peptide leukotrienes and their hepatobiliary elimination in endotoxin action//Circ. Shock.– 1984.– V.14.– P. 223–235.
19. Wise W.C., Cook J.A., Eller T., Halushka P.V. Ibuprofen improves survival from endotoxic shock in rat//J. Pharmacol. Exp. Ther.– 1980.– V.215.– P. 160–164.
20. Adnot S., Lefort J., Braquet P., Vargaftig B.B. Interference of PAF acether antagonist BN52021 with Endotoxin induced hypotension in the guinea pig//Prostaglandins.– 1987.– V.32.– P. 791–802.
21. Evaluation of cardiac output, total peripheral vascular resistance, and plasma concentrations of vasopressin in the conscious, unrestrained rat during endotoxemia/Brackett D.J., Schaefer C.F., Tompkins P. et al.// Circ. Shock.– 1985.– V.12.– P. 273–284.



22. Parker J.L., Adams H.R. Development of myocardial dysfunction in endotoxin shock//*Am. J. Physiol.*– 1985.– V.248.– P. H818–H826.
23. Freudenberg M.A., Galanos C. Induction of tolerance to lipopolysaccharide (LPS) o-galactosamine lethality by pretreatment with LPS is mediated by macrophages//*Infect. Immun.*– 1988.– V.56.– P. 1352–1357.
24. Pathophysiology of Shock, Sepsis, and Organ Failure/Eds. G.Schlag, H.Redl.– Berlin: Springer-Verlag, 1993.– 1153 p.
25. Bahrami S., Paul E., Redl H., Schlag G. Endotoxemia in rats – influence of lipoxigenase blocker versus leukotriene receptor antagonist (BW755C vs. LY 171883)// *Bacterial endotoxins: pathophysiological effects, clinical significance, and pharmacological control*/Ed. by A.Sturk.– New York: Liss, 1988.– P. 283–292.
26. Wyler F., Neutze J.M., Rudolph A.M. The effects of endotoxin on distribution of cardiac output in unanesthetized rabbits//*Am. J. Physiol.*– 1970.– V.219.– P. 246–251.
27. Systemic and regional hemodynamic effects of cyclooxygenase and thromboxane synthetase inhibition in normal and hyperdynamic endotoxemic rabbits/Fink M.P., Morrissey P.E., Stein K.L. et al.//*Circ. Shock.*– 1988.– V.26.– P. 41–57.
28. Law W.R., Ferguson J.L. Naloxone alters organ perfusion during endotoxin shock in conscious rats//*Am. J. Physiol.*– 1988.– V.255.– P. H1106–H1113.
29. Greenway C.V., Lauth W.W., Stark R.D. Separation of acute and delayed hemodynamic responses to endotoxin in the cat//*Am. J. Physiol.*– 1969.– V.217.– P. 518–521.
30. Further observations of mesenteric vasoconstriction, survival and the clotting defect after endotoxin administration/Cohen M.M., Greenway C.V., Innes I.R. et al.//*Br. J. Pharmacol.*– 1973.– V.48.– P. 555–569.
31. Arita H., Ogle C.K., Alexander J.W., Warden G.D. Induction of hypermetabolism in guinea pigs by endotoxin infused through the portal vein//*Arch. Surg.*– 1988.– V.123.– P. 1420–1424.
32. Freudenberg M.A., Galanos C. Induction of tolerance to lipopolysaccharide (LPS) D-galactosamine lethality by pretreatment with LPS is mediated by macrophages//*Infect. Immun.*– 1988.– V.56.– P. 1352–1357.
33. Freudenberg M.A., Galanos C. Tumor necrosis factor alpha mediates lethal activity of killed gram-negative and gram-positive bacteria in D-galactosamine treated mice//*Infect. Immun.*– 1991.– V.59.– P. 2210–2215.
34. Effect of gram-negative endotoxin on levels of serum corticosterone, TNF $\alpha$ , circulating blood cells, and the survival of rats/Feuerstein G., Hallenbeck J.M., Vanatta B. et al.//*Circ. Shock.*– 1990.– V.30.– P. 265–278.
35. Bahrami S., Redl H., Buurman W.A., Schlag G. Endotoxin shock related disorders induced by high-vs low-dose lipopolysaccharide (LPS) injection in rats//*Eur. Surg. Res.*– 1991.– V.23 (Supple 1).– P. 60.
36. Takada H., Galanos C. Enhancement of endotoxin lethality and generation of anaphylactoid reactions by lipopolysaccharides in muramyl dipeptide treated mice//*Infect. Immun.*– 1987.– V.55.– P. 409–413.
37. Galanos C., Freudenberg M.A., Matsuura M., Coumbos A. Hypersensitivity of endotoxin and mechanism of host–response//*Bacterial endotoxins: Pathophysiological effects, clinical significance, and pharmacological control*/Ed. by A.Sturk.– New York: Liss, 1988.– P. 295–308.
38. Selye H., Tuchweber B., Bartok L. Effect of lead acetate on the susceptibility of rats to bacterial endotoxins//*J. Bacteriol.*– 1966.– V.91.– P. 884–889.
39. Dentener M.A., Grebe J.W., Maessen J.G., Buurman W.A. Role of tumour necrosis factor in the enhanced sensitivity of mice to endotoxin after exposure to lead//*Immunopharmacol. Immunotoxicol.*– 1989.– V.11.– P. 321–334.
40. Bartoleyns J., Freudenberg M.A., Galanos C. Growing tumors induce hypersensitivity to endotoxin and tumor necrosis factor//*Infect. Immun.*– 1987.– V.55.– P. 2230–2233.

41. Induction of hyperreactivity to endotoxin in mice by *Coxiella burnetii*/Schramek S., Kazar J., Sekeyova Z. et al.//*Infect. Immun.*– 1984.– V.45.– P. 713–717.
42. Fish R.E., Spitzer J.A. Continuous infusion of endotoxin from an osmotic pump in the conscious, unrestrained rat; a unique model of chronic endocoxemia//*Circ. Shock.*– 1984.– V.12.– P. 135–149.
43. Fish R.E., Burns A.H., Lang C.H., Spitzer J.A. Myocardial dysfunction in a nonlethal, non-shock model of chronic endotoxemia//*Circ. Shock.*– 1985.– V.16.– P. 241–252.
44. Fish R.E., Lang C.H., Spitzer J.A. Regional blood flow during continuous low-dose endotoxin infusion//*Circ. Shock.*– 1986.– V.18.– P. 267–275.
45. Splanchnic and total body oxygen consumption differences in septic and injured patients/Dahn M.S., Lange P., Lobdell K. et al.//*Surgery.*– 1987.– V.101.– P. 69–80.
46. Hepatic blood flow and splanchnic oxygen consumption measurements in clinical sepsis/Dahn M.S., Lange M.P., Wilson R.F. et al.//*Surgery.*– 1990.– V.107.– P. 295–301.
47. Arita H., Ogle C.K., Alexander J.W., Warden G.D. Induction of hypermetabolism in guinea pigs by endotoxin infused through the portal vein// *Arch. Surg.*– 1988.– V.123.– P. 1420–1424.
48. Fink M.P., Heard S.O. Laboratory models of sepsis and septic shock//*J. Surg. Res.*– 1990.– V.49.– P. 186–196.
49. Jones S.B., Westfall M.V., Sayeed M.M. Plasma catecholamines during *E. coli* bacteremia in conscious rats//*Am. J. Physiol.*– 1988.– V.254.– P. R470–R477.
50. Durkot M.J., Wolfe R.R. Hyper and hypo-dynamic models of sepsis in guinea pigs//*J. Surg. Res.*– 1989.– V.46.– P. 118–122.
51. Pass L.J., Schloerb P.R., Pearce F.J., Drucker W.R. Cardiopulmonary response of the rat to gram-negative bacteremia//*Am. J. Physiol.*– 1984.– V.246.– P. H344–H350.
52. The pathophysiology of septic shock: changes in hemodynamics in rats following live *E. coli* injection. An application of the thermodilution method for measurement of cardiac output/Sato T., Isoyama T., Tanaka J. et al.//*Adv. Shock Res.*– 1982.– V.7.– P. 25–42.
53. Skeletal microcirculatory responses to hyperdynamic *Escherichia coli* sepsis in unanesthetized rats//Cryer H.M., Garrison R.N., Kaebnick H.W. et al.//*Arch. Surg.*– 1987.– V.122.– P. 86–92.
54. Cryer H.M., Unger L.S., Garrison R.N., Harris P.D. Prostaglandins maintain renal microvascular blood flow during hyperdynamic bacteremia//*Circ. Shock.*– 1988.– V.26.– P. 71–88.
55. Sleeman H.K., Diggs J.W., Hayes D.K., Hamit H.F. Values of antibiotics, corticosteroids and peritoneal lavage in the treatment of experimental peritonitis//*Surgery.*– 1969.– V.66.– P. 1060–1066.
56. Prolonged peritoneal lavage and fecal peritonitis/Perkash I., Satpati P., Agawal K.C. et al.//*Surgery.*– 1970.– V.68.– P. 842–845.
57. Browne M.K., Leslie G.B. Animal models of peritonitis//*Surg. Gynecol. Obstet.*– 1976.– V.143.– P. 738–740.
58. Decker G.A.G., Daniel A.M., Blevings S., McLean L.D. Effect of peritonitis on mitochondrial respiration//*J. Surg. Res.*– 1971.– V.11.– P. 528–532.
59. Ahrenholz D.H., Simmons R.L. Fibrin in peritonitis. I. Beneficial and adverse effects of fibrin in experimental *E. coli* peritonitis//*Surgery.*– 1980.– V.88.– P. 41–47.
60. Hau T., Simmons R.L. Surgical pros and cons//*Surg. Gynecol. Obstet.*– 1977.– V.144.– P. 755–756.
61. Treatment with recombinant human tumor necrosis factor-alpha protects rats against the lethality, hypotension, and hypothermia of gram-negative sepsis/ Alexander H.R., Sheppard B.C., Jensen J.C. et al.//*J. Clin. Invest.*– 1991.– V.88.– P. 34–39.
62. Filkins J.P., Cornell R.P. Depression of hepatic gluconeogenesis and the hypoglycemia of endotoxin shock//*Am. J. Physiol.*– 1974.– V.227.– P. 778–781.
63. Montgomery A.B., Stager M.A., Carrico C.J., Hudson L.D. Causes of mortality in patients with the adult respiratory distress syndrome//*Am. Rev. Respir. Dis.*– 1985.– V.132.– P. 485–489.
64. Effect of injury and infection on visceral metabolism and circulation/Wilmore D.W., Goodwin C.W., Aulick L.M. et al.//*Ann. Surg.*– 1980.– V.192.– P. 491–504.

## Розділ IV

# ДОКЛІНІЧНЕ ВИВЧЕННЯ ФАРМАКОКІНЕТИКИ ЛІКАРСЬКИХ ЗАСОБІВ

## ДОКЛІНІЧНЕ ВИВЧЕННЯ ФАРМАКОКІНЕТИКИ ЛІКАРСЬКИХ ЗАСОБІВ

Головенко М.Я., Зіньковський В.Г., Жук О.В.,  
Безверха І.С., Жила В.А.

За науковою редакцією

Даниленка В.С.

### Вступ

Мета фармакокінетичних досліджень полягає у кількісному описанні процесів всмоктування, розподілу та елімінації (біотрансформації та екскреції) лікарських речовин та їх метаболітів у організмі.

Вивчення фармакокінетичних властивостей лікарської речовини доцільно починати на першому етапі доклінічних випробувань, оскільки знання особливостей фармакокінетики дозволяє не тільки визначити перспективні шляхи введення речовини, але й прогнозувати спектр її потенціальних органотропних ефектів, отже провести відповідні фармакологічні дослідження. Фармакокінетичні дані необхідні для встановлення залежності «концентрація-ефект», вони можуть бути використані для прогнозування дії лікарської речовини на людину. На підставі результатів експериментального вивчення фармакокінетики лікарських речовин можливе прогнозування концентрації препарату в крові (плазмі) або швидкість її часового зниження у людини і, таким чином, вибір орієнтовної схеми дозування, яка може бути пізніше уточнена в процесі клінічних випробувань

### 1. Загальні положення

Відповідно до «Нормативних документів щодо реєстрації (перереєстрації) лікарських засобів в Україні» (постанова Кабінету Міністрів України від 13.09.2000 р. за № 1422) для проведення реєстрації установа, інші юридичні чи фізичні особи надають до Державного фармакологічного центру МОЗ України документи відповідно до таких груп ліків:

- I. Нові лікарські засоби.
- II. Лікарські засоби – генерики
- III. Лікарські засоби у нових лікарських формах.

Фармакокінетичні дослідження є обов'язковою складовою частиною доклінічних випробувань лікарських препаратів. Для I і III груп ліків повинен бути проведений повний об'єм фармакокінетичних досліджень.

#### 1.1. Лабораторні тварини

Дослідження фармакокінетики рекомендується проводити на здорових інтактних або наркотизованих тваринах однієї статі (бажано лінійних), точно визначеного віку і маси тіла. Маса тіла не повинна відхилятися від нормального значення для відповідного віку більше ніж на 10%.

Необхідно використовувати не менше двох видів тварин, причому один з них (бажано) не повинен належати до гризунів. Доцільно застосовувати одні й ті самі види тварин для фармакокінетичних, фармакодинамічних і токсикологічних досліджень.

### **1.2. Шляхи, методи і режим введення лікарських засобів**

Необхідно досліджувати фармакокінетику лікарської речовини при тих шляхах введення, які застосовуються при його фармакологічному, хіміотерапевтичному і токсикологічному вивченні. При цьому, навіть якщо лікарський засіб планується застосовувати тільки позасудинним шляхом, рекомендується вивчити фармакокінетику також і при внутрішньосудинному введенні, якщо це дозволяє розчинність лікарської речовини. Такі дані необхідні для оцінки фундаментальних фармакокінетичних параметрів і визначення абсолютної біологічної доступності препарату. Внутрішньовенно лікарські речовини рекомендується вводити у хвостові вени мишей і щурів, вушні вени мурчаків і кролів, стегові вени кішок і собак. При тривалому введенні лікарських засобів допускається заміна внутрішньовенного введення на внутрішньоочеревинне, але у дні проведення повторного фармакокінетичного дослідження лікарську речовину слід ввести тим самим способом, що й при одноразовому введенні, тобто внутрішньовенно.

Перорально лікарські сполуки вводять зазвичай натще (тварини не отримують їжі протягом ночі без обмеження у воді) за допомогою глоточного або дуоденального зонду. Додавання лікарських речовин до їжі або питної води не рекомендується, оскільки в таких випадках важко забезпечити точне дозування.

Внутрішньом'язово лікарські засоби вводять у стегові м'язи, підшкірно – в задні кінцівки мишей, щурів, кішок, собак, ближче до хребта – мурчакам, кролям; нашкірно – на депільовану поверхню спини або черева щурів, мурчаків, кролів, собак.

Залежно від виду лікарської форми можливе закапування розчинів або аплікація мазей на слизову оболонку ока; інстиляція у передню камеру ока; введення супозиторіїв; інгаляція парів, газів, аерозолів, зокрема шляхом поміщення тварин до затравочних камер; внесення лікарських засобів у шкірні або м'язові кишені; імплантація під шкіру, в м'язи чи порожнини тощо.

Обов'язковим елементом доклінічних випробувань є фармакокінетичне вивчення лікарської речовини при її одноразовому введенні.

Фармакокінетику лікарської речовини вивчають при її введенні у кількох дозах (не менше ніж у двох), що відображають діапазон дозувань, при якому реалізується бажаний ефект лікарської речовини без ознак побічної дії. Вивчення фармакокінетики лікарської речовини при її введенні у кількох дозах необхідне для оцінки взаємозв'язку між концентрацією (C) і дозою (D) (перевірка гіпотези лінійності). Висновок про лінійність може бути зроблений за умови збіжності фармакокінетичних кривих, нормованих щодо дози (криві зміни C/D залежно від часу), або якщо значення параметрів фармакокінетики (див. нижче) не залежать від дози. У тих випадках, коли лінійність фармакокінетики зберігається тільки в обмеженому проміжку використаних доз, потрібно навести його межі.

Вивчення фармакокінетики при тривалому введенні лікарської речовини може бути більш обмеженим, спрямованим, головним чином, на виявлення особливостей фармакокінетики (уповільнення або прискорення процесів розподілу, біотрансформації та елімінації), що не проявляються при одноразовому введенні лікарської речовини. Вибір дозування (не менше двох доз) при тривалому введенні лікарської речовини ґрунтується на принципах, описаних вище. Разом з тим, одна з доз повинна бути більш високою (за необхідності) і відповідати використаним дозам в токсикологічних дослідженнях. З одного боку, це дозволяє встановити зв'язок розвитку токсичних ефектів із змінами у фармакокінетиці (наприклад: у результаті насичення процесів ферментативної детоксикації (біотрансформації) чи переносу лікарської речовини). З іншого боку, дозволяє оцінити потенційно токсичні рівні препарату в крові та органах (тканинах). Тривалість введень, що повторюються, і інтервали між ними можуть від-

повідати використаним у фармакологічних (хіміотерапевтичних) і токсикологічних дослідженнях (як правило, 24 год). Результати фармакокінетичного дослідження при тривалому введенні лікарської речовини необхідно порівняти з даними його фармакокінетики, отриманими після одноразового введення (чи зберігається «принцип сумації доз» і т.д.).

### **1.3. Регламент фармакокінетичного експерименту**

#### **Біологічний матеріал, в якому визначається концентрація лікарської речовини**

Найважливішим елементом фармакокінетичного вивчення лікарських речовин є дослідження динаміки зміни їх концентрації у крові (плазмі, сироватці крові). Така інформація дозволяє отримати загальні уявлення про фармакокінетичні властивості лікарської речовини (лінійність чи нелінійність фармакокінетичних процесів, особливості всмоктування при позасудинному введенні, розподілу та елімінації). Складовою частиною цих досліджень є оцінка показників зв'язування лікарських речовин плазмою крові і розподілу між плазмою і еритроцитами. Обидва показники оцінюються при концентраціях лікарської речовини, які відображають діапазон змін її рівнів у плазмі (сироватці) крові *in vivo*.

Разом з вивченням динаміки концентрації речовини в плазмі (сироватці) необхідно досліджувати її розподіл у тканинах. При виконанні цього дослідження можна обмежитись одним видом тварин. Вибір тканин відбувається з урахуванням ступеню їх васкуляризації. Як зразок сильно васкуляризованих тканин можливе використання, наприклад, серця чи селезінки, помірно васкуляризованих – тканини м'язів, слабо васкуляризованих – очерев'я, шкіри чи кістки (у всіх випадках – по одному виду матеріалу). Крім того, необхідно отримати дані з розподілу лікарської речовини в органах, що забезпечують елімінацію (печінка, нирки) і у зоні потенційної дії (наприклад, тканина легенів, якщо фармакотерапевтичний засіб пропонується застосовувати при пневмонії, або тканина головного мозку, якщо його будуть застосовувати при захворюваннях мозку і т.д.).

Оптимальним є дослідження кінетики розподілу загальної радіоактивності (сумарного  $^{14}\text{C}$ -матеріалу) в органах і тканинах, визначення вмісту вихідної  $^{14}\text{C}$ - чи  $^3\text{H}$ - лікарської сполуки і її метаболітів і/або загальної радіоактивності в плазмі крові, печінці та нирках (екскреторних органах) та у біофазі (зоні) потенційної дії.

Результатом вивчення розподілу лікарської речовини в тканинах є виявлення тих з них, до яких вона інтенсивно проникає, або в яких тривалий час утримується, що може мати істотне значення для фармакодинамічних досліджень.

Необхідно вивчити екскрецію лікарської речовини з сечею, жовчю, фекаліями. Важливою особливістю такого дослідження є характеристика швидкості екскреції (відношення кількості лікарської сполуки, що виділилась за фіксований проміжок часу, до тривалості інтервалу взяття проб у різні періоди після введення препарату) і/або кумулятивної екскреції (сумарна кількість лікарської сполуки, що виділилась з даним видом екскрету, за весь період спостереження). Вичерпна інформація може бути отримана при дослідженні кінетики виділення з сечею і калом дослідних тварин загальної радіоактивності, вихідної  $^{14}\text{C}$ - (або  $^3\text{H}$ -) лікарської сполуки і основних груп її метаболітів (глюкуронових і неглюкуронових кон'югатів, вільних продуктів біотрансформації та ін.). При цьому кінетична схема біотрансформації та екскреції сполуки, що досліджується, включає в описання всю введену дозу мічених ліків. Незалежно від особливостей аналізу даних (за швидкістю екскреції чи за кумулятивною екскрецією) збір екскрету, що вміщує лікарську сполуку і метаболіти, мусить проводитись порційно, в інтервалі досліду, що складає 3–5 величин  $T_{1/2}$  виділення.

У тих випадках, коли максимальна кількість лікарської сполуки, що виділилась з екскретатами, значно нижче (менше 50%) введеної дози, бажано з'ясувати, чи не містяться в екскретатах продукти метаболізму вихідної лікарської речовини. Детальне вивчення кінетики утворення і елімінації метаболіту проводиться тільки за умови, що в елімінації препарату вклад процесу

перетворення лікарського засобу у вказаний метаболіт перевищує 20%, а метаболіт проявляє біологічну активність.

Зазначені види біологічного матеріалу використовуються і при вивченні фармакокінетики лікарської речовини при його тривалому введенні.

#### **Тривалість фармакокінетичного експерименту**

Визначається тривалістю виявлення лікарської речовини у виді біоматеріалу, що досліджується, але у всіх випадках мусить бути не менше ніж 3–5 величин періоду напіввиведення. При вивченні фармакокінетики лікарської речовини, що дуже повільно елімінує, тривалість спостереження за його концентрацією в біоматеріалах може бути скорочена до 3-х періодів напіввиведення.

При фармакокінетичному вивченні лікарських речовин у складі лікарських форм, що забезпечують пролонговане звільнення активного компоненту, спостереження за концентрацією потрібно проводити, у крайньому разі до початку моноекспоненційного (кінцевого) відрізка фармакокінетичної кривої.

#### **Регламент відбору проб біоматеріалу**

Регламент визначається формою кривої «концентрація лікарської речовини – час» – чим складніша форма, тим частіше потрібно відбирати проби, тому що для надійної оцінки фармакокінетичних параметрів потрібна більша кількість точок. Разом з тим, регламент відбору проб мусить бути достатньо економним.

Оскільки априорно визначити регламент важко, доцільно спочатку провести пробні дослідження на обмеженій кількості тварин при введенні їм лікарської речовини в найвищій з планованих доз. При цьому доцільно здійснити виміри в часові проміжки дослідження, що зростають у геометричній прогресії з періодом, що дорівнює 2 (наприклад, через 0,25, 0,5; 1; 2; 4; 8 годин і т.д.).

У будь-якому випадку вибір моментів часу для відбору проб мусить забезпечити отримання кількох (але не менше 2-х) точок для кожного фрагменту фармакокінетичної кривої. Особливу увагу слід звернути на її кінцевий відрізок, нахил якого визначає величину основних фармакокінетичних параметрів. У зв'язку з цим, бажано відібрати 3–4 проби біоматеріалу в період найбільш повільного зниження концентрації лікарської речовини. Отримана в результаті дослідження кінетична інформація дозволяє оцінити період напіввиведення лікарської речовини і таким чином, визначити необхідну тривалість спостереження за концентрацією (або швидкістю екскреції) лікарської речовини для наступного основного дослідження.

### ***1.4. Методи кількісного визначення концентрації лікарських речовин у біологічному матеріалі***

Для визначення концентрації лікарських речовин у біоматеріалі можуть бути використані різні методи (фізико-хімічні, імунологічні, мікробіологічні та ін.), що забезпечують можливість впевненого спостереження за концентрацією препарату при вибраних умовах фармакокінетичного експерименту, зокрема, його тривалості, що складає 3–5 періодів напіввиведення.

Для лікарських речовин I і III груп найкраще використовувати радіометричні методи визначення вмісту мічених сполук (вихідних сполук, метаболітів, загальної радіоактивності), що ґрунтуються на рідинній сцинтиляційній фотометрії. Це дозволяє отримати статистично коректні значення одиничних і групових вимірів. Для інших методів визначення лікарських речовин (I і III груп) необхідне наведення метрологічних характеристик аналізу.

### ***1.5. Опрацювання фармакокінетичних даних***

#### **Немодельні оцінки фармакокінетичних параметрів**

Аналіз дослідних даних може бути здійснено на підставі математичного апарату формальних або фізіологічних (перфузійні моделі) лінійних чи нелінійних моделей або на підставі немодельної оцінки фармакокінетичних параметрів.

Критерієм достатності проведеного аналізу є:

а) статистична коректність розрахункових значень фармакокінетичних параметрів; відповідність розрахункових значень кінетики вмісту ліків у внутрішньому середовищі організму і кінетики їх екскреції дослідним величинам;

б) сукупність фармакокінетичних параметрів, визначених для ліків груп I і III, повинна в загальних рисах описувати загальні процеси взаємодії «ліки-організм» для всієї введеної дози сполуки.

Незалежно від способу аналізу дослідних даних, його результати повинні включати ряд розрахункових величин, наведених нижче.

Наведений приклад базується на немодельній оцінці фармакокінетики, яка може завжди бути легко здійснена як основний метод аналізу або паралельно іншим (модельним) підходам в аналізі дослідних даних. При умові лінійності для характеристики фармакокінетичних властивостей лікарської речовини можна використовувати параметри, значення яких не залежить від структури відповідної математичної моделі (немодельні параметри).

При внутрішньосудинному введенні лікарської речовини оцінюється загальний кліренс ( $CL_t$ ), що відображає швидкість звільнення від препарату одиниці об'єму біорідини.

Величина  $CL_t$  визначається відношенням дози ( $D$ ) до площі під кривою «концентрація-час» ( $AUC$  у межах від 0 до  $\infty$ ):

$$CL_t = D/AUC \quad (1)$$

Ще один параметр – стаціонарний об'єм розподілу ( $V_{ss}$ ), що відображає вираженість розподілу лікарської речовини в організмі, визначається добутком  $CL_t$  на середній час утримання ( $MRT$  – середній час перебування в організмі молекули препарату):

$$V_{ss} = CL_t MRT \quad (2)$$

В свою чергу, величина  $MRT$  може бути розрахована за формулою:

$$MRT = AUMC/AUC,$$

де  $AUMC$  – площа під кривою «добуток часу на концентрацію лікарської речовини – час».

Поряд з параметрами  $CL_t$ ,  $V_{ss}$  і  $MRT$  має бути наведена тривалість періоду напіввиведення ( $T_{1/2}$ ), що відображає час, протягом якого концентрація лікарської речовини знижується вдвічі. Величина  $T_{1/2}$  може бути розрахована за формулою:

$$T_{1/2} = 0,693/\beta, \quad (3)$$

де  $\beta$  – показник експоненти, що характеризує швидкість зниження концентрації препарату на кінцевому (монокспоненційному) відрізку фармакокінетичної кривої. В одночастинній кінетичній схемі величина  $\beta$  співпадає з коефіцієнтом елімінації ( $k_{el}$ ), а  $MRT$  – з величиною  $k_{el}^{-1}$ .

Оцінка інтенсивності проникнення препарату до тканин може бути отримана шляхом обчислення тканинної доступності ( $f_t$ ), що визначається відношенням значення  $AUC$  (бажано в границях від 0 до  $\infty$ ) у тканині до відповідної величини  $AUC$  у крові:

$$f_t = AUC_{тканина}/AUC_{кров} \quad (4)$$

Крім того, з цією ж метою можна оцінювати уявний коефіцієнт розподілу ( $K_d$ ) лікарської речовини між кров'ю і тканиною, що визначається відношенням відповідних концентрацій в один і той же проміжок часу на кінцевих (монокспоненційних) відрізках фармакокінетичних кривих при умові, що їх нахили (і для крові, і для тканини) характеризуються близькими значеннями показників експоненти  $\beta$  чи  $k_{el}$ :

$$K_d = C_{тканина}/C_{кров} \quad (5)$$

Інтенсивність виведення лікарської сполуки з досліджуваним видом екскрету характеризується екскреторним кліренсом, що відображає швидкість звільнення одиниці об'єму крові від препарату в результаті його екскреції. При дослідженні екскреції лікарської сполуки з сечею оцінюється нирковий кліренс ( $CL_R$ ), що визначається відношенням швидкості екскреції до



середньої концентрації препарату у відповідний період часу або відношенням кумулятивної екскреції ( $M_c$ ) до AUC препарату в крові:

$$CL_R = M_c / AUC. \quad (6)$$

Ненирковий кліренс ( $CL_{NR}$ ) лікарської речовини оцінюється за різницею між загальним і нирковим кліренсом:

$$CL_{NR} = CL_t - CL_R. \quad (7)$$

При позасудинному введенні лікарської речовини характеристика її фармакокінетичних властивостей включає оцінку параметрів MRT,  $T_{1/2}$ , уявного кліренсу ( $C_{ev}$  – відношення дози до AUC), а також параметрів біодоступності  $f$  (абсолютний ступінь всмоктування) і MAT (середній час всмоктування) при наявності даних про фармакокінетику препарату при внутрішньосудинному введенні. Величина  $f$  може бути обчислена із співвідношення AUC при позасудинному (ev) і внутрішньосудинному (iv) введеннях лікарської речовини:

$$f = AUC_{ev} / AUC_{iv}, \quad (8)$$

а MAT – за різницею між значеннями  $MRT_{ev}$  і  $MRT_{iv}$ :

$$MAT = MRT_{ev} - MRT_{iv}.$$

Разом з наведеними вище формулами для немодельних параметрів можуть бути використані і значення фармакокінетичних констант, визначених у процесі математичного моделювання фармакокінетики лікарських речовин.

Крім перелічених параметрів, можуть бути наведені показники максимальної концентрації ( $C_{max}$ ) лікарської речовини і час її досягнення ( $T_{max}$ ), а також будь-які інші розрахункові величини, що були використані при моделюванні фармакокінетики ліків авторами дослідження.

У тих випадках, коли фармакокінетика лікарської речовини є нелінійною, характеристика її фармакокінетичних властивостей може бути обмежена приведенням значень AUC,  $T_{1/2}$ , а також  $C_{max}$  і  $T_{max}$  у випадку позасудинного введення.

#### **Камерне моделювання фармакокінетики лікарських сполук**

Процеси надходження до внутрішнього середовища, розподілу в організмі метаболізму та екскреції ліків і їх метаболітів традиційно оцінюють, використовуючи камерні моделі.

Критерієм вірності поділу організму на деяку кількість камер є не ступінь наближення до анатомо-фізіологічної структури, а виключно принцип математичної правдоподібності. Вибір тієї чи іншої моделі для інтерпретації результатів фармакокінетичних дослідів повинен відповідати загальним принципам моделювання у прикладній математиці, котрі забезпечують найкращий ступінь надійності прогнозування «поведінки» лікарського засобу в організмі за тих чи інших умов.

Припускається, що доза ( $D$ ) ліків необоротно з константою швидкості процесу першого порядку ( $k_{01}$ ) надходить до ін'єкційної камери моделі (1). Якщо введення внутрішньосудинне ( $k_{01} \rightarrow \infty$ ), вся доза ( $D$ ) миттєво надходить у (1) і початкова концентрація ( $C_0$ ) препарату у (1), що іноді співпадає з початковою концентрацією у крові, складає  $C_0 = D/V_1$  ( $V_1$  – об'єм камери (1)). Ін'єкційна камера зворотно або незворотно пов'язана із низкою інших камер, а вони між собою – процесами першого порядку з константами швидкості ( $k_{ij}$ ,  $ij$  – напрям масопереносу ліків з  $i$ -тої камери до  $j$ -тої). Ліки всередині кожної камери ( $i$ - $j$ ) рівномірно розподілені в її об'ємі ( $V_i$ ). Процеси екскреції – необоротні, першого порядку, з константами швидкості (наприклад, якщо  $j$ -та камера – екскреційна:  $k_{je}$ ). При моделюванні згідно з однокамерною, однокамерною зі всмоктуванням, двокамерною і двокамерною зі всмоктуванням моделями (що складають основу фармакокінетичного аналізу), ін'єкційна камера (1) одночасно функціонує і як екскреційна і має назву «центральна».

1. Однокамерна модель. У однокамерній моделі весь організм представлено однією камерою (1). Таке уявлення рівнозначне припущенню про фармакокінетичну однорідність усіх тканин,

до яких препарат може проникати. Однокамерність моделі припускає не однакові значення концентрації у тест-тканині та інших тканинах, об'єднаних поняттям камери, а лише постійне співвідношення між рівнями препарату в них у період спостереження за фармакокінетикою (що для  $i$ -тої камери досягається за умов:  $k_{1i}$  та  $k_{i1} \gg k_{01}$  та  $k_{1ci}$ , тоді камери (1) і ( $i$ ) можуть бути формально об'єднані в одну (1)).

Існує два варіанти однокамерної моделі. Перший передбачає миттєве надходження препарату безпосередньо до камери – однокамерна модель без всмоктування при внутрішньосудинному введенні; другий – надходження препарату в організм протягом деякого проміжку часу – однокамерна модель зі всмоктуванням, при всіх інших способах введення.

**2. Двокамерні моделі.** При аналізі концентраційних кривих фармакокінетики часто виявляється їх біекспоненційність. Тоді припускають, що у сукупності тканин і біологічних рідин організму можна виділити дві групи, що репрезентуються двома камерами (тобто організм розглядається у рамках двокамерної моделі), які відрізняються швидкістю процесів зворотного масопереносу ліків. Оскільки проникнення препарату до тієї чи іншої тканини залежить від її кровопостачання, відносно доступними для препарату звичайно вважають кров, інтерстиційну рідину та сильно васкуляризовані тканини серця, мозку, легенів, нирок, печінки і ендокринних залоз, а менш доступними – решту тканин. Класифікація тканин за цим принципом є умовною, тому що характер розподілу препарату в організмі залежить від багатьох інших факторів (розчинність у ліпідах, зв'язування з альбумінами крові, білками різної природи у тканинах та ін.). Але вона допомагає пов'язати фізіологічні уявлення з апроксимацією фармакокінетики ліків двокамерною кінетичною схемою (моделлю), центральна камера (1) якої репрезентує першу групу тканин, а периферична (2) – другу. Вони пов'язані зворотним процесом масопереносу з константами швидкості процесу першого порядку ( $k_{12}$  і  $k_{21}$ ). За аналогією з однокамерною моделлю кінетики ліків у організмі існують двокамерна модель без всмоктування та зі всмоктуванням, відповідно.

На відміну від наведених вище класичних, але формальних моделей, перфузійні (фізіологічні) моделі ґрунтуються на уявленнях про пропорційний зв'язок між кров'ю і тканинами і інтенсивністю кровопостачання останніх, що дозволяє надати камерам моделі реальний фізичний зміст, оцінити параметри, що характеризують процеси розподілу препаратів у крові та органах, а не у камерах.

Засоби математичного опису перфузійних моделей принципово аналогічні класичному (формальному). Але замість констант типу ( $k_{ij}$ ,  $k_{ji}$ ) до рівняння вводять параметри швидкості кровотоку крізь орган ( $Q$ ), коефіцієнти розподілу препарату між органом і кров'ю ( $R$ ), константи Міхаеліса-Ментен (якщо процеси нелінійні, наприклад, реакції метаболізму; ізотермі зв'язування у випадку формалізації їх взаємодії з білками крові). У цих випадках застосовують методи числового інтегрування з використанням ЕОМ.

### Нелінійні (ферментативні) моделі

Якщо одним з істотних процесів елімінації ліків у організмі є ферментативний процес (що при високому рівні вмісту препарату у метаболічній камері перебігає як нелінійний), виникає необхідність введення у систему рівнянь, що описують фармакокінетику ліків, нелінійного (ферментативного) процесу в інтегральній формі.

Основні величини (параметри), методи їх обчислення та вибір моделі для обчислення дослідних даних (кінетики вмісту ліків у крові – плазмі, сироватці) детально наведені у методичному посібнику «Методические рекомендации по компьютерным расчетам фармакокинетических параметров лекарственных средств (линейные частевые модели)», затвердженому Державним фармакологічним центром МОЗ України.

### **Вивчення метаболізму лікарських препаратів**

Для нових лікарських препаратів (група I) при проведенні фармакокінетичного дослідження у більшості випадків доцільним є не лише визначення параметрів розподілу в органах і тканинах та виділення з організму вихідної сполуки або загальної кількості радіоактивного мате-

ріалу (якщо у розпорядженні дослідника є мічений аналог ліків), але й дослідження їх метаболізму в організмі лабораторних тварин.

Основною характеристикою ступеня трансформації екзогенних сполук (зокрема – ліків) в організмі у метаболіти є величина відносної ефективності екскреції вихідної сполуки з організму у незміненому вигляді ( $\omega_1$ ):

$$\omega_1 = \frac{[\sum S_B]_t}{D_B}$$

де  $[\sum S_B]_t$  – сумарна кількість виведеної з організму у незміненому стані вихідної сполуки за час досліду  $t$ ,  $t \geq 5T_{1/2}$ , після її введення у дозі ( $D_B$ ).

Застосування цього показника доцільне при можливості кількісного визначення вихідної сполуки у сечі, калі, а за необхідності – й у повітрі. Тоді дослідження не потребує застосування мічених сполук.

Другий (надійніший) показник – величина відносної ефективності біотрансформації ( $\omega_2$ ), що визначається на підставі даних сумарної екскреції незміненої вихідної сполуки (міченої радіонуклідом), та кількість загального радіоактивного матеріалу  $[\sum S_{\text{сум}}]_t$  за тих же умов ( $t \geq 5T_{1/2}$ ):

$$\omega_2 = \frac{[\sum S_i]_t}{[\sum S_{\text{сум}}]_t}$$

Якщо величина  $\omega_1$  невірогідно відрізняється від одиниці, а  $\omega_2$  – від нуля – екзогенна сполука в організмі підлягає біотрансформації у незначній мірі.

Загалом, ліки за показниками метаболізму можна поділити на такі групи:

а) сполуки, що переважно виділяються з організму у незміненому стані ( $\omega_1 \approx 1$ ,  $\omega_2 \approx 0$ , наприклад, закис азоту, діетиловий ефір та ін.);

б) ліки, що інтенсивно перетворюються у неактивні метаболіти ( $\omega_1 \approx 0$ ,  $\omega_2 \approx 1$ , наприклад, лоразепам, тазепам, 0,9 введеної дози яких виділяється у вигляді глюкуронових кон'югатів);

в) ліки, що трансформуються у метаболіти, декотрі з яких є фізіологічно активними. Динаміка їх фармакологічного ефекту обумовлена присутністю в організмі «ансамблю», складовими частинами якого є незмінена вихідна сполука та сума фармакологічно активних метаболітів (наприклад, діазепам і його вільні (некон'юговані) метаболіти – диметилдіазепам, оксазепам та ін.).

г) проліки (метаболічні попередники лікарських сполук), фармакологічний ефект яких обумовлений їх біотрансформацією в організмі у фармакологічно активні метаболіти. Власної фармакологічної активності вихідні сполуки (проліки) не виявляють (наприклад, проліки – пронтозил, негітидамідобензофенони, їх метаболіти – стрептоцид, 1,4- бенздіазепіни).

Для першої («а») групи сполук (якщо експериментально доведено, що  $\omega_1 \approx 1$ ), а для другої («б») групи (якщо доведено, що метаболіти не виявляють фізіологічної, тобто, фармакологічної та токсичної дії) детальне вивчення метаболізму недоцільне.

Для коректного фармакокінетичного аналізу ліків третьої («в») та четвертої («г») груп, необхідним є дослідження часового вмісту в органах і тканинах та екскреції вихідних сполук та їх активних метаболітів. При вивченні фармакокінетики проліків (група «г») необхідним є паралельне дослідження розподілу в організмі і екскреції фізіологічно активних метаболітів (ліків) при їх безпосередньому введенні лабораторним тваринам. Якщо величини відносних ефективностей екскреції незмінених ліків ( $\omega_1$ ) та біотрансформації ( $\omega_2$ ) невідомі або не можуть бути визначені через відсутність міченого аналогу та кількісних методів визначення у екскретах вихідної сполуки, підставами до ретельного вивчення метаболізму можуть бути такі факти:

1. Сполука активна у дослідах *in vitro*, але неактивна (або проявляє істотно відмінні кількісні чи якісні показники активності) *in vivo*.

2. Відсутня однозначна залежність «доза-ефект» при одноразовому введенні сполуки тваринам.

3. Показники залежності «доза-ефект», зокрема величина  $ED_{50}$ , змінюються на фоні тривалого попереднього введення ліків.

4. Показник залежності «доза-ефект», величина  $E_{\max}$  ( $E_{\max} - E_{\text{контр}}$ ;  $E_{\max}/E_{\text{контр}}$ ) залежить від часу досліджу при одноразовому введенні ліків.

5. Проявляються видові або статеві відмінності у фармакологічному чи токсикологічному експериментах.

На підставі хімічної структури сполуки можна апіорно зробити припущення про основні напрямки її метаболізму детерміновані генетично. Останнє стосується ацетилтрансфераз, які каталізують приєднання ацетильної групи до аміногруп екзогенних сполук, якщо субстанція мічена дейтерієм; глюкуронової кон'югації первинних, вторинних і третинних оксогруп тощо.

Вивчення процесів метаболізму ліків у організмі здійснюється за такою схемою:

1) дослідження показників розподілу і екскреції вихідної сполуки; визначення величини  $\omega_1$ ;

2) дослідження показників розподілу і екскреції загальної радіоактивності з організму дослідних тварин після введення їм мічених радіонуклідом ліків; визначення  $\omega_2$ ;

3) дослідження показників розподілу і екскреції основних груп метаболітів із відмінними фізико-хімічними властивостями: вільних, кон'югованих, зв'язаних з білками біопроб, залишкових водорозчинних тощо;

4) дослідження показників розподілу і екскреції окремих метаболітів. Цьому етапу передую визначення фізико-хімічними методами їх структури та фізико-хімічних властивостей;

5) порівняльне дослідження показників екскреції та розподілу вихідної сполуки, сумарної радіоактивності, основних груп метаболітів та їх окремих представників (аналогічно пунктам 1–4) за умов попереднього тривалого введення ліків та їх мічених аналогів. Необхідний етап при дослідженні показників накопичення ліків у організмі за умов нелінійності процесів їх біотрансформації, індукції (репресії) ферментних систем та інших чинників, що змінюють відносну ефективність кінетики їх масопереносу і метаболізму в організмі;

6) порівняльне дослідження показників екскреції та розподілу фізіологічно активного метаболіту (продукту біотрансформації проліків) при безпосередньому його введенні до організму у зіставленні з аналогічними показниками, що визначаються за умов введення тваринам біохімічного попередника метаболіту (проліків).

Вивчення метаболізму ґрунтується на кількісних фізико-хімічних методах визначення вихідної сполуки та продуктів їх біотрансформації (радіометричних, спектрофотометричних, спектрофлюориметричних, полярографічних, тощо), яким передують процеси попереднього виділення (екстракційні методи) очищення від коекстрактивних речовин та розділення (хроматографічні методи). Встановлення структури метаболітів звичайно здійснюється методами мас-спектрометрії, хромато-мас-спектрометрії, інфрачервоної спектрометрії. Оптимальним є зустрічний синтез структурних аналогів метаболітів та порівняння їх фізико-хімічних властивостей з сполуками, що були виділені з біологічного матеріалу.

## **2. Фармакокінетичні дослідження лікарських речовин**

### ***Фармакокінетичні дослідження оригінальних (нових) лікарських речовин та препаратів у нових лікарських формах***

Дослідження фармакокінетики нових і таких, що не застосовувалися раніше як лікарські речовини, а також комбінованих препаратів, що містять відомі (такі, що застосовувалися раніше) і нові речовини, доцільно проводити з використанням мічених аналогів нових лікарських сполук.

Рекомендується синтезувати  $^{14}\text{C}$ - або  $^3\text{H}$ - сполуки-аналоги нових речовин з питомою активністю ( $A_{\text{мол}}$ )=0,1–5,0 Ки/моль (3,7–185 ГБк/моль) і здійснити визначення їх вмісту в біологічних середовищах (крові, плазмі, органах і тканинах дослідних тварин, їх екскретах) на основі рідинної сцинтиляційної фотометрії та зонної або скануючої радіохроматографії. Виконання

наведених рекомендацій дозволяє оцінити кінетичну схему речовини, визначити відносну ефективність екскреції та біотрансформації сполуки та її метаболітів; визначити статистично коректні фармакокінетичні параметри при подальшому моделюванні досліджуваних процесів.

Методичні переваги використання мічених сполук при дослідженні фармакокінетики нових лікарських речовин значно перевищують витрати, пов'язані з необхідністю синтезу відповідних радіоактивних зразків, і відповідають рівню розвитку і вимогам сучасної світової експериментальної фармакології.

### 3. Рекомендація вибору дози лікарської речовини для I фази клінічних випробувань

При дослідженні біодоступності відтворених ліків (група II) значення величин відносної і абсолютної (якщо виникає необхідність) біологічної доступності, визначені в експерименті, є достатньо однозначною рекомендацією, яка може бути врахована при плануванні клінічних випробувань.

На підставі фармакокінетичних досліджень нових речовин (групи I і III) необхідне формування ряду фармакокінетичних характеристик, рекомендацій і методичних вказівок для клінічних випробувань:

1. Загальні фармакокінетичні характеристики ліків:

а) біологічна доступність (абсолютна і відносна), припущення щодо біодоступності при клінічних випробуваннях;

б) основні шляхи метаболізму, його відносна ефективність, можливості клінічних досліджень вмісту метаболітів в біологічних рідинах;

в) особливості кінетичної схеми розподілу з наведенням органів (тканин) «депо» чи відсіків (зон) повільного обміну препаратів, характеристики фармакокінетичної фази взаємодії препарату і організму (наприклад: препарат з пролонгованою дією, або що інтенсивно трансформується у неактивні метаболіти і т.д.).

2. Рекомендації з вибору дози лікарської речовини.

Відповідно до загальноприйнятих уявлень, вибір дози лікарської речовини для I фази (оцінки переносності, безпечних схем введення, фармакокінетичних властивостей) клінічних випробувань здійснюється на підставі результатів токсикологічних дослідів. Разом з тим, для препаратів, що характеризуються значним терапевтичним індексом, така доза може бути оцінена за даними комплексної фармакодинаміки і фармакокінетики лікарської речовини у тварин. У таких випадках розрахунок ефективної дози базується на співвідношеннях між масою ( $m$ ) і поверхнею тіла ( $S$ ) людини і тварини. При цьому припускається, що мінімальна ефективна доза, віднесена до ( $S$ ), у людини і тварини однакова. Для відповідних підрахунків доцільно користуватись таблицею.

Таблиця

**Співвідношення між дозами лікарської речовини у людини (маса тіла – 70 000 г) і тварин (у дужках – стандартна маса тіла в г)**

Миша (20)	Щур (200)	Мурчак (400)	Кроль (1500)	Кішка (2000)	Мавпа (4000)	Собака (12000)	Людина (70000)
387,9	56,0	31,5	14,2	13,0	6,1	3,1	1,0

Примітка:  $S(\text{cm}^2) = 11,2 m^{2/3}$

Для отримання результату дозу у тварин потрібно помножити на число, вміщене у відповідній графі таблиці. Наприклад, якщо мінімальна ефективна доза лікарської сполуки для щура масою 200 г складала 10 мг, то відповідна доза для людини масою 70000 г буде у 56 разів вищою, тобто 560 мг. Наведений підхід є одним з висновків «теорії подібності», що припускає нелінійне зростання фізіологічних параметрів ( $y$ ) зі збільшенням маси тіла ( $m$ ):

$$Y = am^b, \text{ де } b = 0,25-0,75.$$

Слід враховувати, що використана в експериментальному фармакокінетичному дослідженні доза не обов'язково є оптимальною для фармакотерапевтичних цілей.

На підставі визначених параметрів фармакокінетики ліків доцільно розрахувати прогноз їх накопичення, рівні коливання концентрацій при тривалому введенні; зробити порівняння цих параметрів зі значеннями граничних допустимих і терапевтичних концентрацій у плазмі крові.

3. За результатами експериментальних досліджень, в усякому разі, у випадках, коли фармакокінетика лікарської речовини описується одночастинною моделлю, можливе прогнозування її фармакокінетичного профілю у людини. При цьому припускається, що внутрішньосудинне введення препарату людині у дозі, яка в перерахунку на одиницю поверхні тіла еквівалентна використаній у досліді на тваринах, забезпечує створення у крові людини такої ж початкової концентрації. Подальше зниження рівнів лікарської речовини можна прогнозувати з урахуванням співвідношення між значенням  $T_{1/2}$  у тварин і людини:

$$T_{1/2} = (m_{\text{люд.}}/m_{\text{твар.}})^{0,25} \cdot T_{1/2\text{твар.}}$$

Більше того, за допомогою прогнозування значення  $T_{1/2}$  можна орієнтовно оцінити необхідну тривалість спостережень за концентрацією препарату при клінічних дослідженнях фармакокінетики, а отже, провести його цілеспрямовано.

4. Рекомендації з використання фізико-хімічних та інших методів кількісного визначення ліків та їх метаболітів у біологічних рідинах людини.

Перелічені рекомендації не є обов'язковими. Клінічні випробування плануються на підставі ряду медичних і медико-біологічних показників, що забезпечують ефективність і безпечність застосування препаратів, що досліджуються. Результати фармакокінетичного аналізу, рекомендації і прогнози потрібно приймати до уваги при плануванні клінічних випробувань поряд з іншими показниками.

### 4. Звітна документація про фармакокінетичне дослідження

У звіті про дослідження фармакокінетики повинні бути наведені відомості про використаних лабораторних тварин (вид, лінія, стать, вік, маса тіла), їх утримування до дослідження, стан на час проведення дослідження (притомність чи наркоз). При роботі з наркотизованими тваринами повинні бути наведені дані про застосовані препарати, їх дози і т.д.

Необхідно навести інформацію про способи введення препаратів і відбору біоматеріалу, підготовку і збереження проб. Важлива також інформація про стабільність нових лікарських речовин і про максимальний термін зберігання зразків біорідин, що їх вміщують. Необхідно докладно описати методику визначення концентрації препаратів у біологічних рідинах. Охарактеризувати використанні реактиви, дати відомості про застосовані прилади і обладнання. Метрологічні характеристики методики повинні включати пороги чутливості, діапазон лінійності, точність, відтворюваність. Результати визначення концентрації лікарської речовини бажано навести у графічній формі.

Слід вказати методи обрахунку параметрів фармакокінетики. Якщо при цьому використовувалась комп'ютерна техніка, потрібно навести дані про застосовані програмні засоби.

Насамкінець слід навести орієнтовні дози для I фази клінічних випробувань і період напіввиведення оригінальної лікарської речовини, оцінені способами, викладеними у розділі 1.

## Література

1. Соловьев В.Н., Фирсов А.А., Филов В.А. Фармакокинетика (руководство).– М.: Медицина, 1980.– 423 с.
2. Журавлев С.Г., Ермаков В.В. Биомедицинские математические модели и их идентификация//Итоги науки и техники.– М.: ВИНТИ, 1989.– Т.3.– 218 с.
3. Головенко Н.Я. Механизмы реакций метаболизма ксенобиотиков в биологических мембранах.– К.: Наук. думка, 1981.– 220 с.
4. Фирсов А.А., Пиотровский В.К. Фармакокинетические методы в биофармации//Итоги науки и техники.– М.: ВИНТИ, 1984.– Т.14.– С. 114–227.
5. Фирсов А.А., Назаров А.Д., Черных В.М. Фармакокинетические подходы к оптимизации антибиотикотерапии//Итоги науки и техники.– М.: ВИНТИ, 1989.– Т.17.– 403 с.
6. Пиотровский Е. Использование кинетики метаболизма и выведения токсических веществ в решении проблем промышленной токсикологии.– М.: Медицина, 1976.– 195 с.
7. Пиотровский В.К.//Фармакол. и токсикол.– 1986.– №5.– С. 118–127.
8. Холодов Л.Е., Яковлев В.П. Клиническая фармакокинетика.– М.: Медицина, 1985.– 464 с.
9. Экспериментальная и клиническая фармакокинетика//Сб. тр. НИИ фармакологии АМН СССР/Под ред. А.В.Вальдмана и В.П.Жердева.– М., 1988. – 143 с.
10. Головенко Н.Я., Зиньковский В.Г., Жук О.В., Станкевич Е.А. Экспериментальная фармакокинетика гидазепамы//Гидазепам.– К.: Наук. думка, 1992.– С. 20–49.
11. Basic Pharmacokinetics/Ed. by M.C.Makoid, 1999.
12. Gibaldi M. Biopharmaceutics and clinical pharmacokinetics. 4th ed.– Philadelphia: Lea & Febiger, 1991.
13. Welling P.O. Pharmacokinetics, processes and mathematics.– Washington D.C.: Am. Chem. Society, 1986.

## **Доклінічні дослідження лікарських засобів (методичні рекомендації)**

За редакцією член-кореспондента АМН України О.В. Стефанова

Підписано до друку 27.08.01 Формат 60×84/8  
Папір офсет. Гарніт. Петербург. Друк офсетний  
Умов. друк. арк. 66  
Тираж 1000 прим. Зам. № Д 63

ТОВ «Видавничий дім «Авіцена» 03150, Київ–150, а/с 302  
Свідоцтво про державну реєстрацію № 22970288  
від 24.01.1996 р.

**Д 63**      **Доклінічні дослідження лікарських засобів  
(методичні рекомендації)**

**За редакцією:** член-кор. АМН України О.В. Стефанова – К.: Авіцена, 2001 р., – 528 с.

Видання має на меті уніфікацію методичних підходів до вивчення нешкідливості та специфічної активності лікарських засобів – однієї з найважливіших складових процесу створення ліків.

Видання базується на принципах належної лабораторної практики (GLP) і узагальнює досвід провідних фахівців України з питань пошуку та доклінічного вивчення лікарських засобів.

Видання призначене для дослідників, інших фахівців, що працюють у сфері створення та впровадження ліків.

**ББК 52.81**  
**Д 63**  
**УДК 615.2.01**

© Видавничий дім «Авіцена», 2001 р.