

## **Оценка специфической токсичности субстанции и готовой лекарственной формы антипротеиназного средства овомин**

*ГУ “Республиканский научно-практический центр гематологии и трансфузиологии”  
Министерства здравоохранения Республики Беларусь<sup>1</sup>,  
Научно-исследовательское и проектно-конструкторское РУП “МБИ” концерна  
“Белбиофарм”<sup>2</sup>”*

В результате проведенных исследований установлено, что субстанция и готовая лекарственная форма антипротеиназного препарата овомин не обладают мутагенной и канцерогенной активностью, а также эмбриотоксическими и тератогенными свойствами, что позволяет рекомендовать новое отечественное фармсредство для широкого клинического использования в различных областях медицины.

**Ключевые слова:** овомин, овомукод, мутагенная, канцерогенная активность, эмбриотоксические и тератогенные свойства.

Развитие гиперпротеаземии и, как правило, последующая редукция естественного ингибиторного потенциала организма, отмечаемые при патологии, сопровождающейся разбалансировкой системы протеиназы-ингибиторы протеиназ, послужили основанием для разработки и включения в комплексную терапию антиферментных лекарственных средств.

Данная работа является частью комплексного доклинического исследования медико-биологических свойств отечественного антиферментного препарата овомин, субстанцией которого является овомукоид – гликопротеид, выделяемый из белка утиных яиц ( $M_w \sim 31000$ ), обладающий эффективными поливалентными ингибиторными свойствами относительно широкого спектра сериновых протеиназ, играющих ключевую роль в развитии системных расстройств при критических и терминальных состояниях [3-5, 12].

Изучение возможного токсического действия субстанции и лекарственной формы овомина основывалось на оценке репродуктивной токсичности, включающей эмбрио- и фетотоксическое действие в антенатальном периоде развития, а также на выявлении потенциальной канцерогенной и мутагенной активности.

### **Материал и методы**

В работе были использованы принципы испытаний лекарственных средств на тератогенность и эмбриотоксичность, основанные на правилах тестирования новых лекарственных препаратов [11].

Изучение тератогенной и эмбриотоксической активности готовой лекарственной формы овомина проводили на половозрелых самках крыс линии Вистар массой 200±10 г, находящихся на обычном режиме вивария. Животные были разделены на три серии: опытную и две контрольные. В опытной серии изучали возможное эмбрио- и фетотоксическое действие овомина. Введение препарата осуществляли в различные периоды беременности внутривенно трижды, с интервалом 24 часа в дозировке, пятикратно превышающей среднесуточную терапевтическую – 20 мг/кг. Крысам первой контрольной серии по аналогичной схеме внутривенно инъецировали 3 мл 0,9% раствора натрия хлорида (0,9% NaCl; РУП “Белмедпрепараты”), что соответствовало максимально допустимой по объему дозе для данного вида животных

[1]. Вторая контрольная серия (общий контроль) была сформирована для учета спонтанной эмбриолетальности и аномалий развития зародышей у интактных животных.

Для спаривания самцов подсаживали к самкам в соотношении 1:3. Первым днем беременности считали день обнаружения сперматозоидов в вагинальном мазке.

С учетом того, что чувствительность эмбриона к токсическому действию фармакологических веществ зависит от стадии развития, экспериментальных животных подразделяли на 5 групп исходя из сроков введения препаратов, охватывающих весь период эмбриогенеза. В 1 группе антиферментный препарат вводили на 1-4 сутки беременности; во 2 – на 5-8, в 3 на – 9-11, в 4 на – 12-15 и в 5 группе – 16-19, соответственно. В аналогичные временные интервалы крысам первой контрольной серии вводили 0,9% NaCl. Каждая группа включала не менее 10-15 особей.

На 20-21 сутки беременности животных выключали из опыта декапитацией. После извлечения эмбрионов из матки проводили их внешний осмотр с целью выявления аномалий развития, затем подсчитывали количество живых и мертвых плодов, измеряли кранио-каудальный размер, массу плода и плаценты. Анализировали количество желтых тел в яичниках, а также мест имплантаций и резорбций в матке. Показатели эмбриогенеза и эмбриотоксичности – общую эмбриональную смертность (ОМС), смертность до имплантации (СДИ), смертность после имплантации (СПИ) и выживаемость, рассчитывали по общепринятым формулам [13].

В дальнейшем помет каждой самки разделяли на две части. Одна часть служила для исследования состояния внутренних органов (фиксация жидкостью Боуэна, метод Вильсона), другая – для изучения развития скелета (фиксация в 96% этиловом спирте, метод Доусона) [7].

Высокая вероятность причинной связи между мутагенезом и канцерогенезом, а также высокая частота совпадения мутагенных и канцерогенных свойств фармсредств привели к отбору необходимых тестов, в которых показателем предполагаемой бластомогенной активности служит способность вызывать генные и хромосомные мутации.

Исследование готовой лекарственной формы овомина на возможное проявление мутагенной активности проводили с использованием микроядерного теста и метода учета хромосомных aberrаций в клетках костного мозга мышей линии Af, оценку канцерогенной активности – по анализу количества аденом легких у данного вида животных [2, 6, 8, 9, 14]. Линия мышей Af характеризуется высокой чувствительностью к мутагенам и высокой частотой появления спонтанных опухолей, что позволяет одновременно использовать ее в экспериментах по изучению мутагенеза и канцерогенеза [9]. Экспериментальным животным (мыши массой 20±2 г) антипротеиназный препарат вводили внутривенно пятикратно через 24 часа в дозе, 15-кратно превышающей среднесуточную терапевтическую, что составило (в перерасчете на овомукоид утиных яиц – 1,2 мг на мыш, или 0,06 мг/г). Отрицательным контролем служила серия мышей, в которой по аналогичной схеме вводили растворитель – 0,9% NaCl (1 мл/мыш), положительным – серия животных, получавших мутаген с хорошо изученной активностью, уретан (внутрибрюшинно однократно, в дозе 1 мг/г). С целью максимально полного учета возможных

генетических последствий инфузий овомина препараты костного мозга готовили от 5 животных через 24 и 48 часов после последнего введения.

При проведении микроядерного теста препараты лимфоцитов человека с микроядрами получали по стандартной методике [14]. Гепаринизированную венозную кровь доноров (0,5 мл) культивировали в двух вариантах:

I. Среда RPMI-1640, телячья эмбриональная сыворотка, раствор глутамина, антибиотики в стандартных соотношениях (контрольная серия);

II. Среда RPMI-1640, телячья эмбриональная сыворотка, раствор глутамина, антибиотики, 15-кратная терапевтическая доза препарата овомин (20 мкл 1% раствора овомукоида на 2 мл культуральной среды; опытная серия).

Для проявления возможного канцерогенного эффекта после введения овомина и контрольных растворов (схема введения аналогична таковой при изучении мутагенных свойств) мышей оставляли на 17 недель, после чего выключали из эксперимента дислокацией шейных позвонков, препарировали легкие, фиксировали их в 10% растворе формалина, затем проводили анализ количества аденом.

В каждой серии эксперимента использовали 25-30 мышей.

Результаты и обсуждение

Результаты исследования эмбриотоксических и тератогенных свойств антипротеиназного средства овомин сводятся к следующему.

После вскрытия экспериментальных животных опытной и контрольных серий у эмбрионов не было обнаружено гематом и аномалий развития. При этом все плоды оказались живыми.

Проведение последовательных 9 продольных и поперечных разрезов плодов не выявило различий в состоянии головного мозга: коры больших полушарий, боковых, третьего и четвертого желудочков, мозжечка и продолговатого мозга; не обнаружено аномалий в состоянии гортани, пищевода, спинного мозга, крупных сосудов, слюнных желез; без изменений оказались органы грудной клетки – сердце, легкие, бронхи, а также органы брюшной полости и таза, причем зафиксировано отсутствие гидронефроза почек у всех сравниваемых групп (по срокам беременности).

Анализ костной системы эмбрионов опытной и контрольных серий также не выявил отклонений от нормы в развитии скелета, а также значимых различий в количестве точек окостенения в различных костных образованиях как в период органогенеза (5-15 сутки беременности), так и фетогенеза (16-19 сутки беременности).

Влияние введения овомина на динамику значений показателей эмбриогенеза отражено в таблице 1.

Таблица 1

Параметры эмбриогенеза у крыс при внутривенном введении овомина в различные периоды беременности

Условия эксперимента	Исследуемый показатель					
	Количество желтых тел	Количество эмбрионов	Количество резорбций	Рост плода, мм	Вес плода, г	Вес плаценты, мг
Общий контроль	9,4±0,52	7,5±0,89	0,5±0,27	36,2±1,38	3,59±0,377	618±26
<b>1 группа (1-4 сутки)</b>						
0,9% NaCl	10,2±0,66	6,8±1,11	0,6±0,27	34,6±1,05	3,61±0,242	652±44
Овомин	7,7±0,57***	5,0±0,69*	0,1±0,11	33,4±1,05	3,33±0,233	552±33
<b>2 группа (5-7 сутки)</b>						
0,9% NaCl	9,5±0,69	5,5±0,96	0,3±0,21	35,0±1,33	2,82±0,363	734±39
Овомин	8,4±1,13	4,7±0,93*	0,6±0,24	39,1±0,31**	3,77±0,124**	690±31
<b>3 группа (8-11 сутки)</b>						
0,9% NaCl	10,7±0,60	6,7±0,91	0,5±0,27	38,9±1,55	3,85±0,451	701±36
Овомин	12,4±1,08*	9,3±1,07**	0,1±0,11	37,7±0,96	3,47±0,315	677±23
<b>4 группа (12-15 сутки)</b>						
0,9% NaCl	9,4±1,00	5,7±0,92	0,7±0,34	36,1±1,19	3,24±0,349	738±115
Овомин	9,8±1,10	6,22±1,24	0,2±0,22	37,7±1,23	3,42±0,372	712±75
<b>5 группа (16-19 сутки)</b>						
0,9% NaCl	10,4±0,45	6,7±1,11	0,4±0,31	34,3±0,90	2,92±0,255	705±41
Овомин	9,7±1,00	5,6±0,94	0,6±0,24	35,4±1,19	2,95±0,252	664±31

Примечание: \* и \*\* – достоверность различий по отношению к общей контрольной серии и крысам, получавшим 0,9% NaCl, соответственно, при уровне значимости  $P > 0,05$ .

Введение овомина на 1-4 сутки беременности вызвало уменьшение количества желтых тел и соответственно уменьшение количества эмбрионов, однако это не сказалось на кранио-каудальном размере плодов. Отмеченное во второй группе (5-7 сутки беременности) увеличение размеров плодов на фоне введения овомина было закономерно связано с соответствующим уменьшением количества эмбрионов. Аналогичная картина течения беременности прослеживалась и у животных первой контрольной серии эксперимента.

Установлено, что овомин не оказывает влияния на количество резорбций и вес плаценты, поскольку не выявлено статистически достоверных отклонений этих показателей в сравнении с результатами, полученными в обеих контрольных сериях крыс (табл. 1).

Результаты производных показателей эмбриогенеза, характеризующие эмбриотоксичность овомина, приведены в таблице 2.

Таблица 2

Показатели эмбриотоксичности у крыс при внутривенном введении овомина в различные периоды беременности

Условия эксперимента	Исследуемый показатель			
	Общая эмбриональная смертность, %	Смертность до имплантации, %	Смертность после имплантации, %	Выживаемость, %
<b>1 группа (1-4 сутки)</b>				
0,9% NaCl	33,3	27,4	5,1	66,6
Овомин	34,8	27,3	5,2	65,2
<b>2 группа (5-7 сутки)</b>				
0,9% NaCl	42,1	35,8	5,1	57,9
Овомин	44,0	35,8	10,2	56,0
<b>3 группа (8-11 сутки)</b>				
0,9% NaCl	37,3	24,7	6,9	62,6
Овомин	25,0	24,1	1,2	75,0
<b>4 группа (12-15 сутки)</b>				
0,9% NaCl	39,3	31,9	10,9	60,6
Овомин	36,3	34,1	3,4	63,6
<b>5 группа (16-19 сутки)</b>				
0,9% NaCl	55,6	24,7	5,63	64,4
Овомин	41,3	35,6	3,9	58,6

Введение овомина не оказывало негативного влияния на все изучаемые показатели эмбриогенеза – средние значения ОМС, СДИ, СПИ и выживаемости у крыс опытной серии статистически значимо не отличалось от таковых в группах животных, получавших 0,9% NaCl (рис. 1). Последнее обстоятельство свидетельствует об отсутствии у антипротеиназного препарата овомин способности инициировать и проявлять эмбрио-и фетотоксическое действие в антенатальном периоде развития.

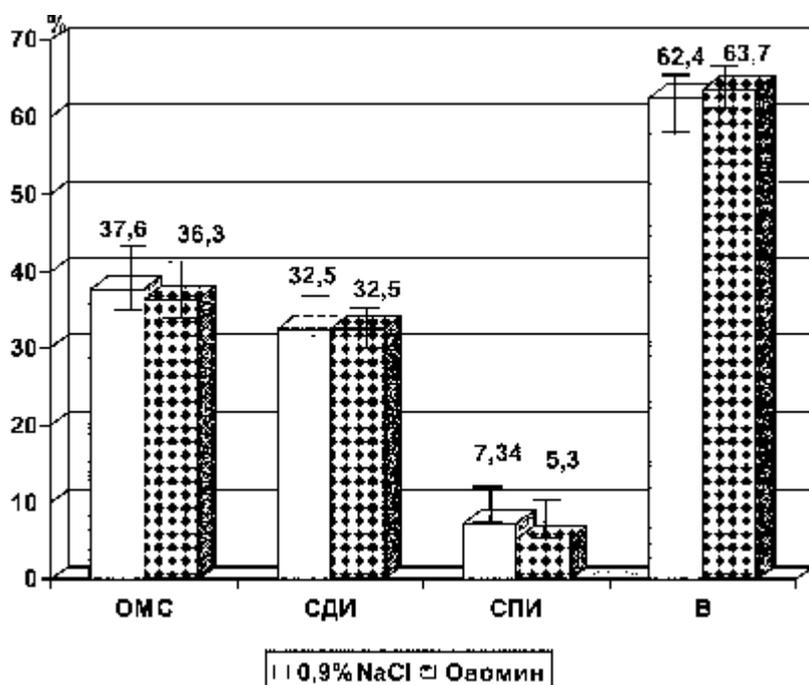


Рис. Средние значения показателей эмбриогенеза (суммарно по 5 группам экспериментальных животных) при введении беременным самкам крыс овомина и 0,9% натрия хлорида. Обозначения: ОМС – общая эмбриональная смертность, СДИ – смертность до имплантации, СПИ – смертность после имплантации, В – выживаемость плодов крыс

Данные по исследованию возможной мутагенной активности овомина приведены в таблице 3.

Как следует из полученных результатов, 15-кратная терапевтическая доза овомина не вызывала достоверного увеличения количества aberrаций хромосом в клетках костного мозга мышей по сравнению с 0,9% NaCl (отрицательный контроль). Aberrации хромосом в обеих сериях опыта были представлены только одиночными фрагментами. Об отсутствии эффекта последействия овомина свидетельствовали и данные по количеству полиплоидных клеток, которое практически не изменялось относительно отрицательного контроля. Следует отметить, что использованный в качестве позитивного контроля уретан вызывал статистически значимое увеличение структурных aberrаций хромосом, которые были представлены как одиночными, так и парными фрагментами, а также многократную элевацию количества полиплоидных клеток.

Таблица 3

Изменение количества aberrаций хромосом в клетках костного мозга мышей линии Af

Условия эксперимента	Количество проанализированных метафаз	Метафазы с абберациями хромосом		Абберации хромосом		Число аббераций хромосом на одну клетку	Количество полиплоидных клеток
		n	$\bar{X} \pm S_x, \%$	одиночные фрагменты	парные фрагменты		
0,9 % NaCl, 24 ч после введения	250	4	1,60±0,79	4	-	0,016	1
0,9% NaCl, 48 ч после введения	150	2	1,33±0,94	2	-	0,013	1
Овомин, 24 ч после введения	100	5	1,25±0,56	5	-	0,013	2
Овомин, 48 ч после введения	380	6	1,58±0,64	6	-	0,016	2
Уретан, 24 ч после введения	300	61	20,33±2,32*	62	12	0,247	9
Уретан, 48 ч после введения	300	14	4,67±1,22*	12	2	0,047	9

Примечание: \* – достоверность различий по отношению к отрицательному контролю (0,9% NaCl) при уровне значимости  $P \geq 0,05$ .

При изучении мутагенной активности овомина с помощью микроядерного теста было установлено, что внесение овомукоида в среду культивирования не вызывало увеличения количества микроядер в лимфоцитах периферической крови человека по сравнению с контролем (табл. 4).

Таблица 4

Влияние субстанции овомина на частоту встречаемости микроядер в лимфоцитах крови человека

Серия опыта	Количество проанализированных биядерных клеток	Количество клеток с микроядрами	% клеток с микроядрами
Опытная (15-кратная терапевтическая доза овомина)	983	3	0,31±0,176
Контрольная (0,9% NaCl)	957	3	0,31±0,181

Результаты исследования возможной канцерогенной активности антипротеиназного препарата овомин представлены в таблице 5.

Таблица 5

Изучение канцерогенной активности готовой лекарственной формы овомина

Серия опыта	Количество мышей в серии	Количество мышей с аденомами		Число аденом	Средне число аденом на мышь
		пп	%		
Отрицательный контроль (0,9% NaCl)	30	4	13,33	4	0,13
Положительный контроль (уретан, 1 мг/г)	11	8	72,70	22	2,00
Овомин (15-кратная терапевтическая доза)	29	4	13,79	4	0,14

Примечание: \* – достоверность различий по отношению к отрицательному контролю при уровне значимости  $P < 0,05$ .

Установлено, что внутривенное введение овомина, взятого в количестве, эквивалентном для 15-кратной терапевтической дозы разработанного антипротеиназного средства, не вызывало увеличения количества аденом легких у мышей линии Af по сравнению с отрицательным контролем.

Введение мышам уретана (положительный контроль, доза 1 мг/г) приводило не только к возрастанию количества мышей с аденомами легких, но и увеличению числа аденом легких на одну мышь (2,0 – в случае уретана против 0,14 и 0,13 при введении овомина и 0,9% NaCl, соответственно).

Таким образом, в результате проведенных исследований установлено, что ни субстанция, ни готовая лекарственная форма антипротеиназного препарата овомин не обладают мутагенной и канцерогенной активностью, а также эмбриотоксическими и тератогенными свойствами, что позволяет рекомендовать новое отечественное фармсредство для широкого клинического использования в различных областях медицины.

1. Арзамасцев Е.В., Березовская Е.В., Гуськова Т.А., Либерман С.С. и др. Требования к доклиническому изучению общетоксического действия новых фармакологических веществ: Временные методические рекомендации. – М., 1985. – 19 с.

2. Бочков Н.П., Шрам Р.Я., Кулешов Н.П., Журков В.С. Система оценки химических веществ на мутагенность для человека: общие принципы, практические рекомендации и дальнейшие разработки // Генетика. – 1975. – т. XI. – № 10. – С. 156-169.

3. Валуева Т.А., Гапанович В.Н., Петров П.Т., Валуев Л.И., Платэ Н.А., Царенков В.М., Матвеев Н.В., Расюк Е.Д. Антипротеиназный препарат / Патент Российской Федерации № 2053789 от 10.02.1996 г. (приоритет от 02.08.1993 г.).
4. Гапанович В.Н., Петров П.Т., Расюк Е.Д., Царенков В.М., Валуева Т.А., Валуев Л.И., Лисовая И.А., Степанюга В.Г. Антиферментный препарат “Овомин”; медико-биологические свойства // Тез. докл. III Всероссийского съезда гематологов и трансфузиологов “Актуальные вопросы гематологии и трансфузиологии”; Санкт-Петербург, 26-28 ноября, 1996 г. – Санкт-Петербург, 1996. – С. 98.
5. Гапанович В.Н., Расюк Е.Д., Бычко Г.Н. Антиферментативный препарат овомин: целевые свойства в условиях экспериментального трипсинового шока // Белорусский медицинский журнал. – 2004. – № 4. – С. 41-44.
6. Захаров И.А., Касимов Г.В., Ковальцова С.В., Марфин С.В. Сравнение быстрых тест-систем для выявления канцерогенной и мутагенной активности химических соединений // Изв. АН СССР (сер. биол.) – 1984. – № 5. – С. 729-743.
7. Методические указания по тестированию тератогенной и эмбриотоксической эффективности новых лекарственных веществ. – М., 1972. – 16 с.
8. Методические рекомендации по исследованию канцерогенных свойств химических веществ и биологических продуктов в хронических опытах на животных. – М.-Л., 1981. – 46 с.
9. Методические рекомендации по проверке мутагенных свойств у новых лекарственных препаратов. – М., 1981. – 35 с.
10. Определение мутагенной активности химических соединений с использованием лабораторных мышей (методические рекомендации). – М, 1985. – 28 с.
11. Правила доклинической оценки безопасности фармакологических средств (GLP). РД 64-126-91. – М., 2000. – 78 с.
12. Расюк Е.Д., Гапанович В.Н., Валуева Т.А., Петров П.Т., Валуев Л.И., Иванов Е.П., Платэ Н.А., Ткачев А.В., Лисовая И.А., Бычко Г.Н. Медико-биологические свойства ингибитора протеиназ овомин // Тез. докл. V Российского национального конгресса “Человек и лекарство”; Москва, 21-25 апреля, 1998 г. – М., 1998. – С. 520.
13. Чернух А.М., Александров П.Н. О тератогенном действии химических (лекарственных) веществ. – М., Медицина, 1969. – 185 с.
14. Hoegstedt B. Micronuclei in lymphocytes with preserved cytoplasm. A method for assessment of cytogenetic damage in man // Mutat. Res. – 1984. – v.130. – P. 63-72