

Методика оценки системы детоксикации ксенобиотиков у лабораторных животных

Г.Д. Капанадзе¹, А.О. Ревякин¹, Е.Б. Шустов²

¹ – ФГБУН «Научный центр биомедицинских технологий ФМБА России», Московская область

² – ФГБУН «Институт токсикологии ФМБА России», Санкт-Петербург

Контактная информация: д.б.н. Капанадзе Гия Джемалиевич, giyak@yandex.ru

В целях более точной оценки безопасности лекарственных средств в преclinical исследованиях была предложена методика оценки системы детоксикации ксенобиотиков у лабораторных животных. Исследование выполнено на двух видах лабораторных животных – лягушках и крысах. В качестве токсического ксенобиотика использовалось два препарата с принципиально различными механизмами действия и разными путями детоксикации – этиловый спирт и цисплатин. Бальная оценка токсического действия ксенобиотиков осуществлялась методом экспертного шкалирования. Проведенное исследование показало, что об эффективности системы детоксикации ксенобиотиков можно судить по данным токсикологических исследований их острой токсичности на основании динамики суммарной балльной оценки выраженности признаков интоксикации.

Ключевые слова: безопасность лекарственных средств, преclinical исследования, система детоксикации, лабораторные животные.

Введение

Система детоксикации организма является ключевой в оценке безопасности лекарственных средств. Несмотря на обилие методических рекомендаций по фармакотоксикологическим исследованиям [3], нам не удалось обнаружить методики оценки именно этого параметра. Очевидной методической сложностью является невозможность в одной методике учесть специфические для конкретных ксенобиотиков виды их токсического действия (нейротоксического, кардиотоксического, нефротоксического, гепатотоксического, миелотоксического и др.). Однако, несмотря на разные аспекты токсического действия конкретного ксенобиотика, в пределах вида лабораторных животных (а иногда – отдельных генетических линий) можно выявить признаки общих,

неспецифических токсических проявлений в картине поведения и внешнего вида животных. Как правило, такие признаки весьма разнообразны и могут иметь признаки разных степеней нарушения физиологических функций (от минимальной выраженности до крайне тяжелых), что позволяет, во-первых, разработать для них полуколичественную шкалу (балльные оценки тяжести проявления интоксикации) и, во-вторых, разработать на их основе интегральную (суммарную) оценку токсического действия ксенобиотика на организм животного.

Такой подход позволяет легко получить динамическую картину развития интоксикации и процессов детоксикации организма, в т.ч. в виде графической (токсикодинамической) кривой (по горизонтальной оси – время от введения

ксенобиотика, по вертикальной оси – суммарная балльная оценка выраженности токсического действия). На такой кривой могут быть выделены фазы токсического процесса: фаза нарастания признаков интоксикации, фаза динамического равновесия (плато) и фаза снижения выраженности интоксикации (фаза детоксикации).

Очевидно, что чем выше введенная доза препарата, тем более напряженно должна будет работать система детоксикации. Поэтому в оценке ее работы необходимо учитывать дозовые особенности и особенности всасывания и распределения ксенобиотика по организму. Для лекарственных препаратов эти особенности, как правило, отражаются в параметрах фармакокинетики.

Нарастание признаков интоксикации будет характеризовать фазу всасывания и распределения ксенобиотика, снижение – фазу его метаболической трансформации и выведения. Нами было принято допущение, что чем мощнее у животного система детоксикации, тем быстрее в картине формирующегося общетоксического действия будут отмечаться признаки его снижения. Поэтому для характеристики эффективности системы детоксикации более значимыми будут не уровневые (например, максимальная выраженность признаков токсического действия), а темповые характеристики – отношение уровня соответствующей фазы к ее длительности, которые будут характеризовать скорости анализируемых процессов.

Материалы и методы

Исследование выполнено на двух видах лабораторных животных – лягушках *Xenopus laevis*, полученных из ФГБНУ

«Всероссийский научно-исследовательский институт ирригационного рыбоводства» (ФГБНУ ВНИИР), и грызунах (беспородных белых крысах-самцах массой 180-210 г, полученных из филиала «Андреевка» ФГБУН НЦБМТ ФМБА России).

Данное исследование было выполнено в соответствии с Европейской конвенцией о защите позвоночных животных, используемых для экспериментальных и других научных целей от 18.03.1986 г. (в редакции Протокола ETS № 170, вступление в силу 02.12.2005 г.), Национальным стандартом РФ ГОСТ Р-53434-2009 «Принципы надлежащей лабораторной практики», приказом Министерства здравоохранения РФ от 01.04.2016 г. № 199н «Об утверждении Правил надлежащей лабораторной практики», Руководством по проведению доклинических исследований лекарственных средств [4].

Данное исследование было рассмотрено биоэтической комиссией ФГБУН НЦБМТ ФМБА России и одобрено для проведения.

Животные содержались в условиях сертифицированного вивария. Длительность карантина (акклиматизационного периода) для всех животных составляла 14 дней. В течение карантина проводили ежедневный осмотр каждого животного (поведение и общее состояние), дважды в день животных наблюдали в клетках (заболеваемость и смертность). Перед началом исследования животные, отвечающие критериям включения в эксперимент, были распределены на группы с помощью метода рандомизации. Животные, не соответствующие критериям, были исключены из исследования в течение карантина.

Лягушки (*Xenopus laevis*) средней массой 24 г содержались в 160-литровых аквариумах с водоочисткой и принудительной аэрацией. Кормление осуществлялось личинками хирономид с добавлением форелевого комбикорма по поедаемости. Температура воды в аквариумах поддерживалась на уровне 15-16°C.

Лабораторные крысы содержались в вентилируемых клетках RairIsoSystem, группами по 3 особи в клетке. В качестве подстила использовали стерильные древесные опилки из нехвойных пород деревьев. В качестве корма – стандартный комбикорм гранулированный полнорационный для лабораторных животных (экструдированный) ПК-120 ГОСТ Р 51849-2001 Р.5. Кормление животных осуществлялось по нормативам в соответствии с видом животных. Водопроводная очищенная вода всем животным давалась *ad libitum* в стандартных поилках. Животные содержались в контролируемых условиях окружающей среды: температура воздуха 20-22°C и относительная влажность 60-70%. Освещение в помещениях – естественно-искусственное. В комнатах содержания животных поддерживался 12-часовой цикл освещения.

В течение исследования каждое животное осматривалось ежедневно. Осмотр включал в себя оценку поведения и общего состояния животных. При введении препарата осмотр проводился примерно через 1 ч после введения.

Животные были распределены по группам методом рандомизации. Каждому отобранному в исследование животному был присвоен индивидуальный номер. Название исследования, номер исследуемой группы, а также индиви-

дуальные номера содержащихся в группе животных указывались на карточке клетки. Оставшиеся после формирования групп животные были включены в стоковую популяцию для использования внутри исследовательской организации.

В качестве токсического ксенобиотика использовалось два препарата с принципиально различным механизмом действия и разными путями детоксикации – этиловый спирт и цисплатин. Дозы ксенобиотиков для оценки динамики симптомов интоксикации выбирались исходя из известных данных об их острой токсичности для соответствующего вида животных при внутрижелудочном пути введения [1].

Для оценки признаков общей интоксикации использовались принципы и критерии, изложенные в работах [2-4]. Наблюдение за животными осуществлялось на протяжении 5-7 (в зависимости от выраженности общетоксического действия) суток. При этом в первые сутки регистрация признаков токсического действия осуществлялась через 1, 2, 4, 8, 16 и 24 ч, на вторые и последующие сутки – 2 раза в день. В случае нормализации поведения животных на вторые и последующие сутки оценка состояния животного проводилась 1 раз в день.

Разработка бальных оценок признаков интоксикации осуществлялась методом экспертного шкалирования с привлечением в качестве экспертов профильных специалистов ФГБУН НЦБМТ ФМБА России. Интегральная (суммарная) оценка выраженности признаков острой интоксикации отражалась графически в виде динамической хроноинтоксикационной кривой, которая подвергалась дальнейшему статистическому и математическому анализу.

Результаты и их обсуждение оценки выраженности признаков
Обобщенная методом экспертно- острой интоксикации представлена в
го шкалирования система бальной табл. 1 и 2.

Таблица 1
Бальная оценка токсического действия ксенобиотиков при остром пероральном введении лягушкам

Признак	Бальная оценка
Нормальное поведение	0
Кратковременные эпизоды возбуждения с последующим угнетением	1
Повторные эпизоды возбуждения, чередующиеся с угнетением	2
Кратковременное выраженное возбуждение, «мечется по аквариуму»	2
Длительная повышенная двигательная активность	2
Длительное выраженное возбуждение, «мечется по аквариуму»	3
Сниженная двигательная активность	2
Выраженная заторможенность, замедленность движений	3
Полная неподвижность, адинамия	4
Одиночные эпизоды судорожных реакций	4
Длительные стойкие судорожные реакции	5
Нетипичное (неадекватное) поведение	3
Не резко выраженная «сморщенность» кожи	4
Резко выраженная «сморщенность» кожи	5
Отечность внешних покровов	4
Реакция на раздражение (повреждение) слизистой рта (пытается лапами освободить пасть от соединения)	3
Подавление аппетита	3
Полный отказ от корма	4
Появление пены из пасти	5
Гибель животного	20

Таблица 2
Бальная оценка признаков интоксикации у мелких грызунов (мыши, крысы)

Признак	Оценка (баллы)
Реакция на взятие в руки	
Типичная умеренная реакция	0
Высокая или низкая реакция	1
Отсутствие реакции	4
Вокализация при перемещении из клетки или взятия на руки	1
Максимальная оценка	5
Осмотр животных в клетке	
Внешний вид (глаза, зрачковый статус, уши, зубы, нос, дыхание, шерсть, тонус мускулатуры, конечности) – норма	0
Ксерофтальмия или слезотечение, отеки	2
Глаза – воспаление, нагноение	2
Экзофтальм	2
Миоз или мидриаз	1
Птоз век	1
Глазная щель полностью закрыта	2
Уши – нагноение, воспаление	1
Уши – бледность или цианотичность	2

Признак	Оценка (баллы)
Зубы – изменение цвета	1
Зубы – сломанные	2
Зубы – выпадение	3
Нос – покраснение	1
Нос - обильные выделения	2
Нос – выделение крови	3
Слюнотечение	1
Взъерошенность шерсти, утрата ее блеска	1
Неестественный цвет или загрязненность шерсти	2
Выпадение шерсти	3
Конечности бледные или гиперемизированные	1
Конечности отечные	2
Истощение	3
Ожирение	2
Кровотечение умеренное	3
Кровотечение выраженное	4
Изменение цвета выделений	1
Наличие крови в выделениях	2
Максимальная оценка	20
Дыхание	
Норма	0
Незначительное кратковременное угнетение дыхания	1
Поверхностное дыхание	2
Периодическое дыхание или одышка	3
Патологические звуки при дыхании	3
Максимальная оценка	6
Тонус мускулатуры	
Норма	0
Тонус мускулатуры пониженный или повышенный	1
Тонус мускулатуры высокий, с судорожными подергиваниями	4
Тонус мускулатуры практически отсутствует	3
Подергивание	1
Тремор	2
Судороги	5
Атаксия	4
Максимальная оценка	9
Двигательная активность	
Двигательная активность, поза, походка – в норме	0
Двигательная активность повышенная или пониженная	1
Возбуждение	2
Утрата позы	4
Заторможенность	2
Нетипичная осанка	2
Нарушение реакции	3
Нарушения координации	3
Заторможенная или неестественная походка (ходьба на цыпочках)	2
Другое необычное поведение	1
Максимальная оценка	15
Общая максимальная оценка	55

Таблица 3

Шкала оценки тяжести интоксикации

Степень тяжести интоксикации	Баллы (суммарно по критериям)
I (легкая)	0-10
II (умеренная)	11-25
III (высокая)	26-55
IV (критическая)	гибель животных

Для интегральной оценки картины интоксикации животных по тяжести экспертами была предложена шкала, представленная в табл. 3.

Результаты исследования динамики выраженности общетоксического действия отдельных ксенобиотиков на лягушках представлены на рис. 1.

В исследовании использованы следующие группы животных:

- Группа 1. Ксенобиотик – спирт этиловый 50% 1 мл.
- Группа 2. Ксенобиотик – цисплатин 1 мл (0,5 мг).
- Группа 3. Ксенобиотик – цисплатин 2 мл (1 мг).

Анализ рис. 1 показывает, что для этилового спирта характерным является кратковременное (до 1 ч) слабо выраженное интоксикационное действие. Цисплатин в малой дозе проявляет также слабое, но длительное (до 5 суток) интоксикационное действие, определяемое, скорее всего, стойкостью связывания ксенобиотика с субстратом своего действия. И только для более высокой дозы цисплатина отмечается выраженное, с трехфазным нарастанием признаков интоксикации, токсическое действие. Наличие третьей фазы нарастания признаков интоксикации может быть

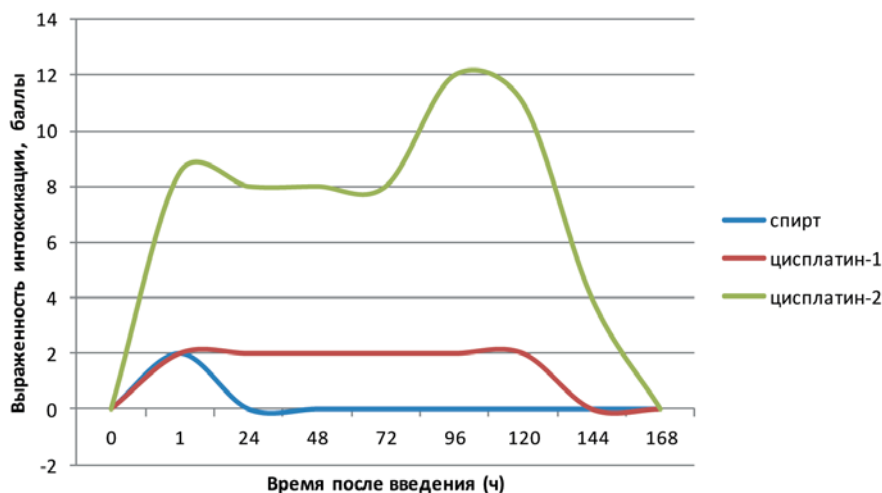


Рис. 1. Динамика выраженности симптомов интоксикации у лягушек при введении ксенобиотиков.

отнесено к накапливающимся, более токсичным метаболитам цисплатина, вносящим вклад в его общетоксическое действие.

Для дальнейшего анализа с представленных хронотоксикологических кривых были сняты следующие первичные показатели:

Ам – максимальное суммарное значение признаков интоксикации;

Тм – время от введения соединения до развития максимальной выраженности интоксикации;

Ат – суммарное значение признаков интоксикации в заданный момент времени Т;

Т – время от введения соединения до момента наблюдения.

Затем определялись производные показатели:

СИ – скорость развития интоксикации ($СИ = А_m / T_m$, балл/ч или балл/сутки);

СД – скорость детоксикации ($СД = (А_m - А_t) / (T - T_m)$, балл/сутки);

МСД – мощность системы детоксикации ($МСД = Д * СД$, мг*балл/кг*сутки, где Д – доза введенного соединения, мг/кг, СД – скорость детоксикации, балл/сутки).

Расчетные параметры модели динамики симптомов интоксикации исследуемыми ксенобиотиками у лягушек представлены в табл. 4.

Для экспериментальной отработки методики оценки системы детоксикации *на грызунах* были выбраны ранее

Таблица 4
Параметры модели общетоксического действия ксенобиотиков у лягушек

Параметр	Ед. измерения	Ксенобиотики		
		Спирт этиловый	Цисплатин-1	Цисплатин-2
Введенная доза	мг/кг	17,5	18	37,5
Максимальная выраженность симптомов интоксикации	баллы	2	2	12
Кол-во фаз нарастания симптомов	ед.	1	1	3
Скорость развития симптомов фазы 1	балл/ч	2	2	8
Длительность фазы плато	сутки	0	5	5
Длительность фазы интоксикации	ч	1	120	144
Длительность фазы детоксикации	сутки	1	6	7
Скорость детоксикации	балл/сутки	1	0,3	1,7
Мощность системы детоксикации	Мг*балл/кг*сутки	17,5	5,4	63,75

Таблица 5

Динамика картины интоксикации этиловым спиртом в дозе 5 мл/кг

Время после введения, ч	Показатели					
	Реакция на взятие на руки	Осмотр в клетке	Дыхание	Тонус мускулатуры	Двигательная активность	Сумма баллов
0-1	1	3	1	2	9	16
1-2	1	4	1	2	9	17
2-4	1	3	1	2	6	13
4-8	1	2	0	1	3	7
8-24	0	1	0	0	2	3
24-48	0	0	0	0	0	0
48-72	0	0	0	0	0	0
72-96	0	0	0	0	0	0
96-120	0	0	0	0	0	0
120-240	0	0	0	0	0	0

использованные в исследованиях на лягушках этиловый спирт (5 мл/кг) и цисплатин (2 и 8 мг/кг). Полученные результаты представлены в табл. 5-7.

Отмечено быстрое наступление токсического эффекта в течение нескольких минут и относительно непродолжительное действие препарата. В течение первых 4 ч степень токсичности определена как «умеренная», от 4 до 24 ч – легкая, и после 24 ч интоксикация отсутствовала.

Картина развития интоксикации у цисплатина в дозе 2 мг/кг отличается,

прежде всего, тем, что основные побочные действия проявляются спустя 2 ч и длятся 3 суток. В течение первых двух часов происходило постепенное нарастание токсических эффектов, и степень токсичности определена как «легкая», а начиная с 3-го ч происходит усиление интоксикации, и до 72 ч степень токсичности держится на уровне «умеренной». Затем происходит процесс «восстановления», и к 10-м суткам признаков интоксикации не отмечается.

Таблица 6

Динамика картины интоксикации цисплатином в дозе 2 мг/кг

Время после введения, ч	Показатели					
	Реакция на взятие на руки	Осмотр в клетке	Дыхание	Тонус мускулатуры	Двигательная активность	Сумма баллов
0-1	0	1	1	0	1	3
1-2	1	1	1	1	1	5
2-4	1	4	2	2	2	11
4-8	1	4	2	2	3	12
8-24	1	6	2	2	3	14
24-48	1	6	2	1	2	12
48-72	1	6	1	1	1	10
72-96	1	4	1	0	1	7
96-120	1	2	1	0	0	4
120-240	0	0	0	0	0	0

Таблица 7

Динамика картины интоксикации цисплатином в дозе 8 мг/кг

Время после введения, ч	Показатели					
	Реакция на взятие на руки	Осмотр в клетке	Дыхание	Тонус мускулатуры	Двигательная активность	Сумма баллов
0-1	1	4	3	4	4	16
1-2	2	5	6	5	7	25
2-4	2	5	6	6	7	26
4-8	3	5	6	5	8	27
8-24	3	8	4	4	7	26
24-48	2	8	3	3	5	21
48-72	2	8	2	3	5	20
72-96	1	6	2	3	2	14
96-120	1	3	2	2	1	9
120-240	1	1	1	1	1	5

Динамика нарастания побочных эффектов после введения цисплатина в дозе 8 мг/кг характеризуется более быстрой и выраженной интоксикацией. Так, в течение 1-го и 2-го ч токсичность имеет уровень «умеренная», а начиная с 3-го и до 24-го ч после введения – третью, «высокую» степень. Третьи и четвертые

сутки степень токсичности вновь опускается до «умеренной» и, начиная с пятых суток, переходит в категорию «легкая». Полностью токсические эффекты не проходят до 10-ти суток.

В графическом виде динамика тяжести интоксикационных проявлений у грызунов представлена на рис. 2.

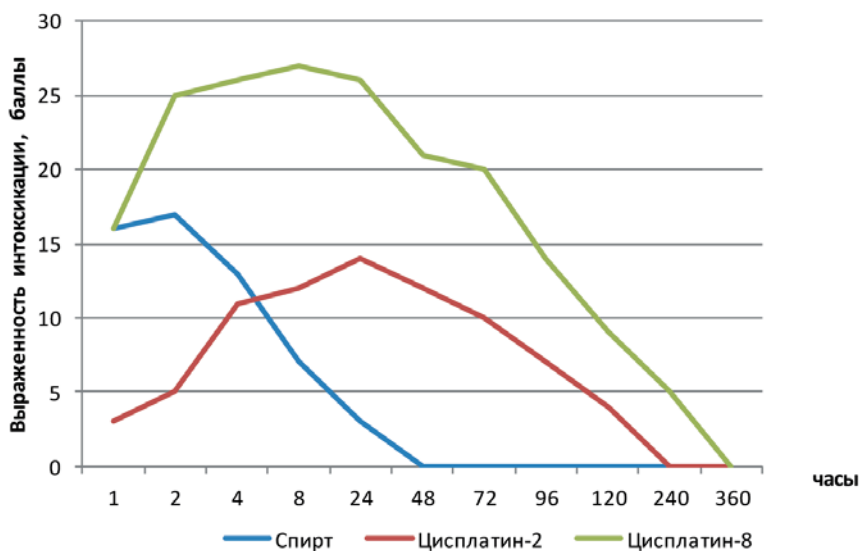


Рис. 2. Динамика картины интоксикации грызунов этиловым спиртом и цисплатином в разных дозах.

Анализ рис. 2 показывает, что для этилового спирта характерным является кратковременное (до 2-х ч) умеренно выраженное интоксикационное действие. Цисплатин в малой дозе проявляет также слабое, но длительное (до 5-ти суток) интоксикационное действие, определяемое, скорее всего, стойкостью связывания ксенобиотика с субстратом своего действия. И только для более высокой дозы цисплатина отмечается выраженное, с двухфазным нарастанием признаков интоксикации, токсическое действие.

Расчетные параметры модели динамики симптомов интоксикации у лабораторных крыс представлены в табл. 8.

Анализ табл. 8 показывает, что грызуны имеют врожденную мощную систему детоксикации, способную быстро метаболизировать этиловый спирт. В то же время, для цисплатина такая врожденная система обладает малой метаболической активностью, но характеризуется способностью к индукции при использовании более высоких доз.

Заключение

Таким образом, проведенное исследование показало, что об эффективности системы детоксикации ксенобиотиков можно судить по данным токсикологических исследований их острой токсичности на основании динамики суммарной балльной оценки выраженности признаков интоксикации.

Для оценки эффективности системы детоксикации могут быть использованы следующие количественные параметры:

СИ – скорость развития интоксикации ($СИ = A_m / T_m$, балл/ч или балл/сутки, где A_m – максимальное суммарное значение признаков интоксикации, T_m – время от введения соединения до развития максимальной выраженности интоксикации);

СД – скорость детоксикации ($СД = A_m / T_d$, балл/сутки, где A_m – максимальное суммарное значение признаков детоксикации; T_d – длительность фазы детоксикации;

Таблица 8
Параметры модели динамики выраженности признаков общетоксического действия ксенобиотиков у лабораторных крыс

Параметр	Ед. измерения	Ксенобиотики		
		Спирт этиловый	Цисплатин-1	Цисплатин-2
Введенная доза	мг/кг	5	2	8
Максимальная выраженность симптомов интоксикации	баллы	17	14	27
Кол-во фаз нарастания симптомов	ед.	1	1	2
Скорость развития симптомов фазы 1	балл/ч	8,5	0,58	1,12
Длительность фазы плато	сутки	0	0	0
Длительность фазы интоксикации	ч	2	24	24
Длительность фазы детоксикации	сутки	1	8	12
Скорость детоксикации	балл/сутки	17	1,75	2,25
Мощность системы детоксикации	Мг*балл/кг*сутки	85	3,6	18

МСД – мощность системы детоксикации ($МСД = Д * СД$, мг*балл/кг*сутки, где Д – доза введенного соединения, мг/кг, СД – скорость детоксикации, балл/сутки).

Список литературы

1. Альберт А. Избирательная токсичность: физико-химические основы терапии. В 2-х томах. - М.: Медицина. 1989. Т. 1. 400 с.; Т. 2. 432 с.
2. Арзамасцев Е.В., Гуськова Т.А., Березовская И.В., Любимов Б.И., Либман С.С., Верстакова О.Л. Методические указания по изучению общетоксического действия фармакологических веществ // Рук-во по экспериментальному (доклиническому) изучению новых фармакологических веществ. - М., 2005. С. 41-54.
3. Каркищенко Н.Н. Альтернативы биомедицины. Т. 2. Классика и альтернативы фармакотоксикологии. - М.: Изд-во ВПК. 2007. 448 с.
4. Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств.

Ч. 1 / Под ред. А.Н. Миронова. - М.: Гриф и К. 2012.

References

1. Al'bert A. Izbiratel'naya toksichnost': fiziko-himicheskie osnovy terapii. V 2-h tomah. - M.: Medicina. 1989. T. 1. 400 s.; T. 2. 432 s.
2. Arzamascev E.V., Gus'kova T.A., Berezovskaya I.V., Lyubimov B.I., Liberman S.S., Verstakova O.L. Metodicheskie ukazaniya po izucheniyu obshchetoksicheskogo dejstviya farmakologicheskikh veshchestv // Ruk-vo po ehksperimental'nomu (doklinicheskomu) izucheniyu novykh farmakologicheskikh veshchestv. - M., 2005. S. 41-54.
3. Karkishchenko N.N. Al'ternativy biomeditsiny. T. 2. Klassika i al'ternativy farmakotoksikologii. - M.: Izd-vo VPK. 2007. 448 s.
4. Rukovodstvo po provedeniyu doklinicheskikh issledovaniy lekarstvennykh sredstv. Ch. 1 / Pod red. A.N. Mironova. - M.: Grif i K. 2012.

Method of evaluating the xenobiotic detoxification system in laboratory animals

G.D. Kapanadze, A.O. Revyakin, E.B. Shustov

In order for more accurately assess the safety of research in pre-clinical studies have proposed the technique of an estimation of system of detoxification of xenobiotics in laboratory animals. The study was performed on two species of laboratory animals – frogs and rats. As toxic xenobiotic we used two medications with fundamentally different mechanisms of action and different ways of detoxification – ethyl alcohol and cisplatin. Scoring of toxic action of xenobiotics was carried out by the method of expert scaling. The study showed that the effectiveness of the detoxification system of xenobiotics can be judged according to their Toxicological studies acute toxicity on the basis of the dynamics of the total point scoring of severity of signs of intoxication.

Key words: drug safety, pre-clinical research, the system is the detoxification, laboratory animals.