

**Малышкина Наталья Александровна,**  
к.б.н., доцент, Ангарский государственный технический университет,  
e-mail: almana@inbox.ru

**Юшков Геннадий Георгиевич,**  
к.м.н., Ангарский государственный технический университет

**Моторина Ирина Геннадьевна,**  
к.м.н., Иркутская государственная медицинская академия последипломного образования Минздрава РФ

**Юшков Антон Геннадьевич,**  
Иркутский научный центр хирургии и травматологии Федерального агентства научных организаций РФ

## **МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ФАРМАКОЛОГИЧЕСКОГО И ТОКСИКОЛОГИЧЕСКОГО ИЗУЧЕНИЯ ИНДОЛОВ**

**Malyshkina N.A., Yushkov G.G., Motorina I.G., Yushkov A.G.**

## **MATERIALS AND METHODS OF PHARMACOLOGICAL AND TOXICOLOGICAL STUDY OF INDOLES**

**Аннотация.** Представлены материалы и методы фармакологического и токсикологического изучения производных индола. Обоснован выбор экспериментально-биологических моделей для эксперимента.

**Ключевые слова:** индол, 3-хлорацетилиндол, 3-метиламиноацетилиндол.

**Abstract.** The materials and methods of pharmacological and toxicological study of indole derivatives are presented. The choice of experimental biological models for the experiment is justified.

**Keywords:** indole, 3-chloroacetylindole, 3-methylaminoacetylindole.

Учитывая возможности использования соединений индола в различных областях жизнедеятельности человека, возникает необходимость их изучения с целью оценки потенциальной и реальной опасности при ингаляционном, пероральном и местном применении. Многовековые наблюдения за эффектами растительных индолов позволили накопить обширный, в том числе и клинический материал, и в целом, получить общее представление об основных проявлениях побочного и токсического действия каждого из представителей ряда индолов на организм. Вместе с тем, фармакологическая индустриализация привела к появлению десятков, если не сотен, полусинтетических и синтетических препаратов, инструктивно требующих детального фармакологического и токсикологического изучения. Поэтому на первый план выходит экспериментальное направление, привлекательное возможностью выделения монофактора в картине ответной реакции организма животного на воздействие. Однако, возникает целый ряд проблем, прежде всего, этического порядка, сопровождающихся обязательностью соблюдения отечественных нормативно-правовых документов:

- «Правила проведения работ с использованием экспериментальных животных» (приложение к Приказу Минздрава СССР № 755 от 12.08.1977г.);

- «Правила лабораторной практики» (приложение к Приказу Минздрава РФ № 708 Н от 23.08.2010 г.).

Следует принимать к сведению и существующие зарубежные требования к использованию лабораторных животных, включая Хельсинскую декларацию Всемирной медицинской ассоциации 1964 года (с изменениями 1975, 1983 и 1989 гг.). Решительный тон защитников животных, несомненно, положительно звучит с этической точки зрения, но на практике доказательной медицины следует исходить из соображений социокультурной целесообразности во благо человека. Активное движение в защиту животных не снизило поголовья лабораторных животных в вивариях научно-исследовательских учреждений медицинского и биологического профиля, более того, появляются новые линии животных, расширяющие возможности моделирования патологических состояний, близких к человеку, что приводит к развитию многих направлений медицинской науки без существенного ущерба для биоэтических норм. Но при этом возникает и еще одна существенная проблема – это выбор вида животных для эксперимента.

Виварии крупных научно-исследовательских учреждений соответствующего профиля, как правило, располагают большим выбором видов лабораторных животных, пригодных для достижения столь же большого набора целей эксперимента. Например, виварий – НИИ биофизики АНГТУ, сертифицированный (вет. удостоверение 238 № 0018304), располагал возможностью комфортного размещения более 10000 голов от мышей до крупных сельскохозяйственных животных разных линий и кроме этого – террариумами для водных животных, а также микробиологической лабораторией, позволяющей работать с культурами тканей.

Чаще всего в мировой практике в качестве экспериментально-биологической модели используются нелинейные крысы (для целей гигиенического исследования) и линии Вистар (для фармакологического исследования). Крысы – это достаточно доступная и адекватная модель, которая размещается на сравнительно небольшой территории, обладает небольшой массой тела и достаточно устойчивая к инфекционным заболеваниям, имеет большой и частый приплод, популяционно-гетерогенная, легко фиксируются рукой человека. Постоянная наполненность желудка крыс позволяет вводить им необходимые для исследования растворы и взвеси без риска повреждения слизистой. У крыс хорошо выражено сходство с организмом человека в основных показателях состояния обмена веществ. В экспериментах предпочтение отдается крысам-самцам (если нет специальных указаний) с их менее отчетливыми гормональными колебаниями. Однако имеются и некоторые особенности, которые ограничивают их использование. На крысах не исследуют функции желудочно-кишечного тракта, поскольку у них отсутствует желчный пузырь. Они мало пригодны для оценки гемостазиологических процессов, особенно тромбообразова-

ния, но это ограничение иногда оказываются преодолимым [1, 3, 4]. Мыши чаще всего используются для оценки общих и немедленных реакций на воздействие, а также для выявления доминантных летальных мутаций. Крысы и мыши удобны для исследования местного и кожно-резорбтивного действия по хвостовой методике, для оценки функционирования центральной и периферической нервной системы.

Хомяки более пригодны для целей экспериментальной онкологии. Морские свинки, в большинстве случаев, используются для выявления эффектов сенсibilизации. Кролики удобны в условиях изучения сердечно-сосудистой системы, местного раздражающего действия на слизистые и для моделирования ожоговой болезни. Во многих случаях рекомендуется использовать собак породы Бигль. Однако в России эта порода мало распространена, в необходимых количествах ее нет и в питомниках.

Нами, в условиях фармакологических исследований ограничено использовалась выродившаяся порода собак - эрдельтерьер с малой массой тела. В данном случае необходимо сделать уточнение, у собак невыраженные процессы ацетилирования, что делает их непригодными для изучения некоторых лекарств и промышленных химических веществ, трансформация которых в организме происходит именно через процессы ацетилирования [8]. Рыбы и другие водные организмы пригодны для целей коммунальной токсикологии и экотоксикологии.

Этот краткий экскурс в область экспериментально-биологического моделирования необходим в силу того, что индол и его соединения в той или иной мере могут затрагивать любую из функционирующих систем организма, и для объективизации этих процессов, необходимо использовать разные виды животных с оценкой состояния их организма по множеству интегральных и частных (специфических) показателей.

В токсикологическом исследовании 3-хлорацетилиндола и 3-метиламиноацетилиндолами были использованы линейные (нелинейные) крысы (возраст—2,5-3 месяца, масса—150-160г) и мыши (возраст —2-2,5 месяца, масса—18-20г.), кролики серой масти и морские свинки собственного разведения (самцы и самки). Животные распределялись по группам (6-10 особей) с учетом массы тела и пола. Каждому отобранному животному был присвоен индивидуальный номер, как и группе, обозначенный пикриновым красителем.

Родоначальная популяция крыс и мышей поступила из племенного хозяйства Государственного научного центра вирусологии и биотехнологии ФС по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека «Вектор» (г. Новосибирск). Критерием включения животных в эксперимент являлось ветеринарное заключение местной службы Госветнадзора, а также заключение Областной ветеринарной лаборатории на бактерионосительство, отсутствие видимых проявлений заболеваний, однородность по массе тела (различия по

массе тела в группах не более 10%) и, в ряде случаев, по анализу периферической крови и некоторым другим показателям. Тест-системы использовали типовые, принятые в экспериментальной токсикологии и фармакологии для данных условий воздействия [5, 6, 7, 9].

Животные содержались в стандартных условиях в соответствии с правилами, утвержденными МЗ СССР 06.07.73г., об устройстве, оборудовании и содержании экспериментально–биологических клиник (вивария):

- температура в помещениях – 18-21°C;
- влажность воздуха – 60-70%;
- воздухообмен – 12-15 объемов помещения/час с фильтрацией приточного воздуха;
- содержание CO<sub>2</sub> в воздухе – 0,12 объемных %;
- содержание аммиака в воздухе – не более 1 мг/м<sup>3</sup>.

Световой режим составлял: 12 часов – свет, 12 часов – темнота.

Крысы и мыши содержались в пластиковых клетках.

Клетки использовались:

- для крыс – пластиковые со съемной металлической решетчатой крышкой и встроенными устройствами для размещения корма и емкости с водой, размером 60x35x20 см;
- для мышей – пластиковые со съемной металлической решетчатой крышкой и встроенными устройствами для размещения корма и емкости с водой, размером 43x28x16 см;
- для кроликов – металлические пластинчатые клетки, размером 70x50x50 см.

На клетку подвешиваются емкости для корма и воды. Подстил для мышей, крыс и морских свинок выполнен из древесной стружки.

Кролики и морские свинки содержались в отдельных металлических клетках по одному. Для кроликов и морских свинок подстил не предусмотрен, только металлическая мелкоячеистая решетка. Кормление животных осуществлялось в соответствии с приказом №755 Минздрава СССР от 12.08.77г.

Животным давалась вода, соответствующая ГОСТу 2874–82 «Вода питьевая» в необходимом количестве. Животные до начала исследований содержались 14 дней для адаптации в помещениях и клетках, предназначенных для подопытных групп. В течение этого периода проводился визуальный осмотр животных для выбраковки особей с отклонениями в общем состоянии и поведении.

Показатели для оценки состояния организма животных в эксперименте были выбраны в соответствии с данным источников информации о характере токсического действия того или иного препарата и требованиям официальных методических руководств. Исследования были проведены в соответствии с нормативной документацией [7, 10, 11, 12, 13].

В качестве показателей состояния организма животных в исследовании были выбраны:

1. Физиологические показатели:

- масса тела (определялась у крыс еженедельно),
- потребление воды крысами определялось ежедневно,
- офтальмологическое исследование было ограничено оценкой состояния слизистых глаза и роговичным рефлексом,
- нагрузочная проба с гексеналом,
- исследовательский (норковый) рефлекс у крыс на открытом поле,
- спонтанная двигательная активность при ее автоматической регистрации у крыс;
- суммационно-подпороговый показатель у крыс с использованием электростимулятора ЭС-50-1 в модификации В.Д. Бартенёва,
- электрокардиография во II ст. отведении, ЧСС у крыс с использованием электрокардиографа с игольчатыми электродами,
- потребление кислорода и выделение углекислого газа автоматическим анализатором Spirolyt-2 (Германия).

2. Гематологические показатели:

- содержание гемоглобина в периферической крови крыс,
- количество эритроцитов,
- количество лейкоцитов,
- количество ретикулоцитов, одновременно и как показатель состояния костного мозга,
- формула крови.

3. Биохимические (исследования сыворотки крови) показатели:

- общий холестерин ферментным методом с использованием наборов реактивов Diocan,
- мочевины кинетическим уреазным методом с использованием набора реактивов Diocan,
- глюкоза глюкозооксидазным методом с использованием набора реактивов Diocan,
- содержание аланинаминотрансферазы в сыворотке крови кинетическим методом YFCC с использованием набора реактивов Diocan,
- содержание аспартатаминотрансферазы с использованием наборов реактивов Diocan,
- общий белок биуретовым методом с использованием набора реактивов Labsystems,
- креатинин.

В связи с трудностями получения необходимого количества сыворотки в одной серии экспериментов ряд показателей оценивался выборочно, но в сроки гипотетически максимального отклонения от контроля. Количественные вели-

чины показателей получены на биохимическом анализаторе BS300 Mindray (Китай) и гематологическом Hemolux (Китай).

4. Показатели клеточного звена иммунитета – величина процента фагоцитоза, фагоцитарное число, фагоцитарный индекс, количество Т-лимфоцитов, В-лимфоцитов, БОК.

5. Показатели аллергенной активности – РСАЛ, компрессная проба, лизис лейкоцитов.

6. Показатели мутагенной активности – количество аберраций и разрывов хромосом в культуре лейкоцитов человека, частота возникновения доминантных летальных мутаций в зародышевых клетках мышей, приводящих к гибели первое поколение на эмбриональной стадии развития, динамика выживаемости потомства.

7. Показатели эмбриотоксичности – количество жёлтых тел, количество мёртвых и живых эмбрионов, количество имплантантов, масса эмбрионов.

При исследовании мочи крыс определяли ее удельный вес. Мочу собирали в обменные клетки чешской фирмы Simax.

При патоморфологическом исследовании осуществлялась аутопсия с макроскопическим описанием, а также измерение относительной массы сердца, легких, печени, селезенки, почек, семенников, щитовидной железы и головного мозга.

В эксперименте осуществляли гистологическое исследование печени, щитовидной железы, легких, почек, желудка с окраской гематоксилин-эозином. В ряде случаев применены гистохимические методы с исследованием окислительно-восстановительных ферментов и других метаболитов.

Полученные данные обрабатывали статистически с помощью лицензионного программного комплекса «Статистика» и «Microsoft Office Excel». Сравнение величин показателей в условиях подчинения закону нормального распределения производили с применением t-критерия Стьюдента. Отличия считались достоверными при  $P \leq 0,05$ . В условиях исследования мутагенности оценивалась величина относительного риска [2].

Для установления величин острой токсичности препараты вводили в виде водного раствора (охлажденная кипяченая вода) через атравматичный металлический зонд в разных дозах крысам и мышам однократно. Для достижения больших доз препарат вводили в 2-3 приема на протяжении 6 часов. В необходимых случаях растворы препаратов вводились внутривентриально, а для оценки раздражающего действия – наносились на выстриженный участок кожи и на конъюнктиву глаз. Ингаляционное воздействие осуществлялось в камерах в различных концентрациях аэрозолем дезинтеграции.

Для оценки кумулятивных свойств препараты вводились ежедневно. Период наблюдения составил 14 суток с регистрацией клиники отравления. Расчет среднесмертельных доз (по Керберу) осуществляли по динамике гибели.

Использование в экспериментах вышеприведенных методов исследования позволило установить характерные признаки острого, подострого и хронического отравления при пероральном, местном и ингаляционном поступлении исследуемых веществ в организм лабораторных животных. К существенным признакам отнесено повышение частоты сердечных сокращений, сохраняющееся и при снижении воздействующей дозы или концентрации 3-хлоратетилиндола. Обратила на себя внимание и достаточно высокая продолжительность гексеналового сна на фоне отчетливого повышения содержания печеночных ферментов в сыворотке крови и относительной массы печени. При этом установлен факт отсутствия мутагенного действия вещества, более того, выявлено его смягчающее действие на мутагенность ТиоТЭФ.

При ингаляционном воздействии в высоких концентрациях до минимального значения снижался в крови процент содержания Т-супрессоров. В экспериментах на морских свинках выявлено повышение величины показателя специфической агломерации лейкоцитов, а в периоде восстановления выявлен факт желудочковой экстрасистолии. Местного раздражающего действия на кожу не установлено. При этом характерные для 3-хлорацетилиндола признаки ответной реакции организма животных на воздействие в случае с 3-метиламинаацетилиндолом не проявились.

В результате проведенных исследований впервые получен обширный объем информации для использования в профилактической токсикологии и фармакологии данных химических соединений и им подобных из вновь синтезированных представителей класса индолов.

## ЛИТЕРАТУРА

1. **Воробьев, В.Б.** Физиология гемостаза / В.Б. Воробьев. – Москва: Проф-Пресс, 2004. – 192с. – Текст: непосредственный.
2. **Гланц, С.** Медико-биологическая статистика (пер. с англ.) / С. Гланц. – Москва: Практика, 1999. – 266 с.– Текст: непосредственный.
3. **Гущина, А.А.** Возможность использования нелинейных крыс для исследования гемостазиологических процессов в условиях токсикологического эксперимента / А.А. Гущина, Г.Г. Юшков – Текст: непосредственный //Материалы научно-практической конференции, посвященной 25-летию создания службы экспериментального биомедицинского моделирования «Лабораторные животные как основа экспериментальной медицины» – 2009 – С.12-13.
4. **Долгов, В.В.** Лабораторная диагностика нарушений гемостаза / В.В. Долгов, П.В. Сварин – Москва: Триада, 2005. – 270с. – Текст: непосредственный.

5. **Елисеева, Ю.Ю.** Анализы. Полный медицинский справочник. Ключевые лабораторные исследования в одной книге / Ю. Ю. Елисеева. – Москва: Эксмо, 2022. – 672 с. – Текст: непосредственный.
6. Лабораторные методы в клинике. Справочник / Под ред. В.В. Меньшикова. – Москва: Медицина, 1987. – с.106-125.
7. **Миронов, А. Н.** Руководство по доклиническим исследованиям лекарственных средств / А. Н. Миронов. – Москва: ФГБУ «НЦЭСМП», 2012. – Т. 1. – 1200 С. – Текст: непосредственный.
8. **Усов, К.И.** О нецелесообразности применения собак в качестве экспериментально-биологической модели при доклиническом исследовании комбинированных препаратов, содержащих изониазид. / К.И. Усов, Г.Г. Юшков, А.А. Гущина, А.С. Гуцин – Текст: непосредственный // Материалы научно-практической конференции, посвященной 25-летию создания службы экспериментального биомедицинского моделирования «Лабораторные животные как основа экспериментальной медицины» – 2009 – С.104-106.
9. **Hodge, H.** Clinical Toxicology of Commercial Products / H. Hodge. – Baltimor: Acute Poisoning Ed IV, 1975 – p.427.
10. **ГОСТ 33044-2014** Принципы надлежащей лабораторной практики (с Поправкой) – Текст: электронный – URL: <http://91.228.224.138:8900/docs> (дата обращения: 12.03.2023).
11. **Приказ № 708н** от 23.08.2010г. «Об утверждении правил лабораторной практики» – Текст: электронный – URL: <http://91.228.224.138:8900/docs> (дата обращения: 12.03.2023).
12. **Приложение к приказу Минздрава СССР № 755** от 12.08.1977г «Правилами проведения работ с использованием экспериментальных животных» – Текст: электронный – URL: <https://www.consultant.ru/cons/cgi/online.cgi> (дата обращения: 12.03.2023).
13. **Федеральный закон от 12.04.2010г. № 61–ФЗ** «Об обращении лекарственных средств» – Текст: электронный – URL: <http://91.228.224.138:8900/docs> (дата обращения: 12.03.2023).