

ДОКЛИНИЧЕСКИЕ ИССЛЕДОВАНИЯ ЭФФЕКТИВНОСТИ И БЕЗОПАСНОСТИ КОМПЛЕКСА БИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНЫХ ВЕЩЕСТВ, ВЫДЕЛЕННЫХ ИЗ МУСКУСА КАБАРГИ СИБИРСКОЙ, В ЛИПОСОМИРОВАННОЙ ЛЕКАРСТВЕННОЙ ФОРМЕ

М.Т. Гасанов*, Ю.В. Фокин, С.Л. Люблинский, О.В. Алимкина, Л.А. Таболякова,
В.Н. Каркищенко

ФГБУН «Научный центр биомедицинских технологий ФМБА России»
143442, Российская Федерация, Московская обл., Красногорский р-н, п. Светлые горы, 1

Субстанции, содержащие биологически активные вещества, получаемые из возобновляемых источников сырья растительного и животного происхождения, в липосомированной форме представляют значительный научно-практический интерес. Липосомированный препарат эффективнее всасывается в желудочно-кишечном тракте, сохраняя свою структуру, легко проникает внутрь клетки и практически не разрушается при первом прохождении через печень, что позволяет использовать меньшее количество действующего вещества при одной и той же биодоступности или увеличивать эффективную действующую концентрацию.

Установлено, что липосомы мускуса кабарги, вводимые в дозах, эквивалентных 300, 1500 и 3000 мг/чел./сут, обладают актопротекторным действием, его выраженность в минимальной дозе (300 мг) сопоставима с таковой максимальной дозы (3000 мг).

Курсовое ежедневное транспалатальное введение липосом мускуса кабарги в течение 14-ти сут статистически достоверно повышает показатели физической выносливости и работоспособности крыс в тесте вынужденного плавания с грузом, кинезогидродинамической модели плавания и в тесте на ротароде. Повышение показателей сохраняется еще в течение 7-ми дней после прекращения введения, что свидетельствует о фармакологической кумуляции. Тестируемый препарат снижает локомоторную и ориентировочно-исследовательскую активность, не оказывает негативного влияния на психоэмоциональный и интоксикационный статус животных и местнораздражающего действия на пути введения, имеет 6-ю степень токсичности (относительно безвредные препараты).

Ключевые слова: мускус, кабарга, липосомы, доклинические исследования, мыши, крысы

Конфликт интересов: авторы заявили об отсутствии конфликта интересов.

Финансирование: работа выполнена в рамках Государственного задания «Клинические исследования лекарственного средства «Мускулив». Разработка технологии получения устойчивой формы наночастиц, содержащих комплекс биологически активных веществ, выделенных из мускуса кабарги, и его доклиническое исследование эффективности и безопасности» (шифр: «Технология-НЦБМТ»).

Для цитирования: Гасанов М.Т., Фокин Ю.В., Люблинский С.Л., Алимкина О.В., Таболякова Л.А., Каркищенко В.Н. Доклинические исследования эффективности и безопасности комплекса биологически активных веществ, выделенных из мускуса кабарги сибирской, в липосомированной лекарственной форме. *Биомедицина*. 2022;18(4):48–62. <https://doi.org/10.33647/2074-5982-18-4-48-62>

Поступила 29.09.2022

Принята после доработки 03.11.2022

Опубликована 01.12.2022

PRECLINICAL STUDIES OF THE EFFICIENCY AND SAFETY OF A COMPLEX OF BIOLOGICALLY ACTIVE SUBSTANCES ISOLATED FROM THE SECRETION OF SIBERIAN MUSK DEER IN A LIPOSOMAL DOSAGE FORM

Melik T. Gasanov*, Yuriy V. Fokin, Stanislav L. Lyublinskiy, Oksana V. Alimkina, Lidiya A. Taboyakova, Vladislav N. Karkischenko

Scientific Center of Biomedical Technologies of the Federal Medical and Biological Agency of Russia
143442, Russian Federation, Moscow Region, Krasnogorsk District, Svetlye Gory Village, 1

Liposomal forms of preparations containing biologically active substances extracted from renewable sources of raw materials of plant and animal origin are attracting considerable research and practical interest. Liposomal drugs are efficiently absorbed in the gastrointestinal tract, retaining their structure while passing through the liver and entering the target cell. This allows either smaller amounts of the active substance to be used without losing bioavailability or its effective concentration to be increased.

Deer musk liposomes administered at doses equivalent to 300, 1500 and 3000 mg/person/day were found to exhibit an actoprotective effect, whose intensity at the minimum dose (300 mg) is comparable to that achieved at the maximum dose (3000 mg).

A course daily transpalatal administration of musk deer liposomes for 14 days was established to statistically significantly improve the indices of physical endurance and working capacity of rats in forced swimming tests under load, kineso-hydrodynamic models of swimming and rotarod performance tests. The observed increase in indicators persisted for another seven days after the cessation of administration, which indicates pharmacological cumulation. The tested drug reduces locomotor and orienting-exploratory activity, at the same time as exhibiting no adverse effect on the psycho-emotional and intoxication status of animals. In addition, no local irritant action on the route of administration was noted. The drug is assigned to toxicity class VI (relatively harmless).

Keywords: musk, musk deer, liposomes, preclinical studies, mice, rats

Conflict of interest: the authors declare no conflict of interest.

Funding: the work was carried out within the framework of the State task "Clinical studies of the drug "Muskuliv". Development of a technology for obtaining a stable form of nanoparticles containing a complex of biologically active substances isolated from musk deer musk, and its preclinical study of efficacy and safety" (code: "Technology-SCBMT").

For citation: Gasanov M.T., Fokin Yu.V., Lyublinskiy S.L., Alimkina O.V., Taboyakova L.A., Karkischenko V.N. Preclinical Studies of the Efficiency and Safety of a Complex of Biologically Active Substances Isolated from the Secretion of Siberian Musk Deer in a Liposomal Dosage Form. *Journal Biomed.* 2022;18(4):48–62. <https://doi.org/10.33647/2074-5982-18-4-48-62>

Submitted 29.09.2022

Revised 03.11.2022

Published 01.12.2022

Введение

В настоящее время при создании новых лекарственных препаратов большое внимание уделяется не только синтезу действующего вещества, но и разработке системы доставки, которая должна обеспечивать быстроту наступления, а также предикативность характера, выраженности и продолжительности эффекта,

нивелировать эффект «первого прохождения через печень», а также создавать и поддерживать терапевтические концентрации действующего вещества в сыворотке крови.

Одной из таких стратегий является инкапсулирование (липосомирование) действующего вещества в водную фазу липосомы или её встраивание в липидный компонент.

В классическом понимании липосомы — это искусственно созданные везикулы, состоящие из одного или нескольких концентрических липидных бислоев, содержащих в себе одну или несколько водных камер. Выделяют моно- и многоламеллярные липосомы, мультивезикулярные липосомы, липосомы, покрытые полимерной оболочкой.

Липосомированный препарат эффективнее всасывается в желудочно-кишечном тракте, сохраняя свою структуру, и при этом практически не разрушается при первом прохождении через печень, что позволяет использовать меньшее количество действующего вещества при одной и той же биодоступности или увеличивать эффективную действующую концентрацию. При попадании к органу-мишени содержимое липосом легко проникает внутрь клетки благодаря биологической совместимости липосомной оболочки с клеточными структурами.

Особого внимания, с точки зрения перспективности предлагаемой лекарственной формы — липосомы, заслуживают субстанции, содержащие биологически активные вещества (БАВ), получаемые из возобновляемых источников сырья растительного и животного происхождения, представляющие научно-практический интерес.

Цель работы — изучить эффективность транспалатинального введения и безопасность (острая и субхроническая токсичности) липосомированной лекарственной формы комплекса биологически активных веществ, выделенных из мускуса кабарги (липосом мускуса кабарги, ЛМК).

Материалы и методы

Дизайн и протокол эксперимента

Данная работа выполнена в ФГБУН «Научный центр биомедицинских технологий ФМБА России» в соответствии с Федеральным законом от 12.04.2010 г. № 61-ФЗ «Об обращении лекарственных средств»; ГОСТ 53434-2009 от 02.12.2009 г.

«Принципы надлежащей лабораторной практики (GLP)»; Руководством по проведению доклинических исследований лекарственных средств (Миронов А.Н., Бунатян Н.Д. и др., 2012); Руководством по лабораторным животным и альтернативным моделям в биомедицинских исследованиях (под ред. Н.Н. Каркищенко и др., 2010) [9]; Приказом Минздрава России от 01.04.2016 г. № 199н «Об утверждении Правил надлежащей лабораторной практики».

Протокол исследования был рассмотрен и одобрен биоэтической комиссией ФГБУН НЦБМТ ФМБА России.

Животные и их содержание

Исследования по изучению эффективности и безопасности проводились на мышах обоего пола линии BALB/c в возрасте около 2 мес. начальной средней массой $21,8 \pm 0,12$ г и лабораторных белых крысах линии WAG/GY в возрасте около 2–2,5 мес. начальной средней массой $213,3 \pm 0,70$ г. Определение показателей субхронической токсичности выполнялось на лабораторных белых крысах обоего пола линии WAG/GY в возрасте около 2–2,5 мес. начальной средней массой $211,6 \pm 0,58$ г. Определение показателей эффективности выполнялось на белых лабораторных крысах Wistar в возрасте около 1,5–2 мес. начальной средней массой 180 ± 20 г.

Лабораторные животные поступили из филиала «Столбовая» ФГБУН НЦБМТ ФМБА России (Московская обл., Чеховский р-н) и распределялись по группам методом рандомизации. В качестве критериев приемлемости рандомизации считали отсутствие внешних признаков заболеваний и гомогенность групп по массе тела ($\pm 10\%$). Длительность карантина для всех животных составляла 14 дней. Животных содержали в соответствии с требованиями ГОСТ Р от 02.12.2009 г. 53434-2009 «Принципы надлежащей лабораторной практики (GLP)» в вентилируемых клетках «Rair Iso System», группами по 5 осо-

бей. В качестве подстилки использовали стерильные древесные опилки из хвойных 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 22–24 °С и относительная влажность 60–70%. Освещение в помещениях — естественно-искусственное. В комнатах содержания животных поддерживался 12-часовой цикл освещения [5, 8].

Исследование эффективности ЛМК

Дозы, способы и длительность введения

В исследовании эффективности введение ЛМК осуществляли транспалатинально.

С учётом технологии получения липосом процент включения в них комплекса БАВ мускуса кабарги составил 50%, что определило начальную эффективную дозу тестируемого препарата, эквивалентную 300 мг/чел./сут. Для верификации эффективной дозы в скрининговом исследовании (тест вынужденного плавания с грузом) были дополнительно изучены ещё две дозы препарата: в 5 и 10 раз превосходящие начальную, т. е. 1500 и 3000 мг/чел./сут. С учётом метаболического коэффициента (для крыс — 5,9) в экспериментах использовали дозы 25, 125 и 250 мг/кг [4]. Курс введения составил 14 дней.

Период наблюдения и регистрируемые показатели

Нагрузочные тесты проводились до введения препарата (фоновые данные), а также на 7-е и 14-е сут через 1 ч ежедневного транспалатинального введения ЛМК. На 21-е сут тесты проводились для оценки следовых эффектов. Анализируемые пока-

затели — выносливость и работоспособность, поведение и психоэмоциональное состояние животных.

Методы оценки психофизиологического статуса животных

Тест вынужденного плавания с грузом

Представляет собой комбинированный жёсткий вид стресса, сочетающий физический и эмоциональный компоненты. Для проведения теста крысам к основанию хвоста прикрепляется груз, составляющий 10% от массы тела. Для оценки физической работоспособности без учёта специфического влияния температурного фактора используется вода термонеutralного для лабораторных животных диапазона 27±1 °С. Высота уровня воды в цилиндре составляет 75–90 см. Расстояние от кромки цилиндра до уровня воды — 20 см. Животное без резких движений погружается в воду, при начале плавательных движений включается секундомер. Критерий завершения теста плавания — погружение животного на дно бассейна без плавательных движений более чем на 10 сек, а также появление пузырьков вытесняемого из легких воздуха. В этот момент секундомер останавливается, а крыса быстро извлекается из воды и обсушивается сухим полотенцем. Анализируемый показатель, отражающий физическую работоспособность, — время предельного плавания.

Кинезогидродинамическая модель плавания

Основной принцип — создание гидроканала с изменяющимся встречным потоком жидкости, который должно преодолевать лабораторное животное. Гидроканал из прозрачного пластика прямоугольной и равнобокой трапециевидной формы в поперечном сечении (размеры 0,4×0,2×0,4 м, длина 120 см) оснащается с торцевых сторон водосборниками, обеспечивающими ламинарность потоков воды, циркуляционным насосом с регулируемой мощностью прокачки, теплообменниками для нагрева или охлаждения

ния прокачиваемой жидкости. Скорость квазиламинарного потока воды — 5 м/мин. Термокомфортная температура воды для данного исследования — 26 ± 2 °С. После периода обучения животное погружается в воду в стартовой зоне, доплывает до финишной зоны (домика-норки), с помощью секундомера регистрируется длительность заплыва, после чего снова возвращается на исходное положение, и тест повторяется до отказа, который является показателем утомления животного. Анализируемые показатели — длительность плавания, количество заплывов, расстояние.

Тест на ротороде

Животное помещается в закрытую камеру (30×30×40 см) с отверстиями для воздухообмена. Пол камеры состоит из стальных стержней, на которые подаётся постоянное напряжение 35–40 В (ток 1 А без учёта сопротивления кожи животных), что вынуждает животное запрыгивать на вращающийся вал (диаметр 7 см, поднят на высоту 15 см от пола) и в течение эксперимента передвигаться на нём со скоростью 1–1,5 об./сек. При начале передвижений животного по валу происходит включение секундомера. Критерием завершения теста служит определяемое визуально снижение выносливости и физическое утомление крысы, падающей на электрический пол камеры и не способной подняться на вал снова. В этот момент секундомер останавливается, а животное извлекается из камеры. Анализируемый показатель, отражающий физическую выносливость, — длительность передвижения животного на ротороде.

Оценка свободного поведения

Регистрация компонентов свободного поведения животных производится с применением автоматизированной системы «Laboras» (Metris B.V., Нидерланды), основанной на анализе вибрации, позволяющей определить тот или иной тип поведения

и позицию животного. Система установлена на платформу измерения, которая конвертирует движения животного в электрические сигналы. Увеличение и смещение предусилителя откорректированы с учётом массы животного. Блок управления одновременно обрабатывает сигналы от четырёх платформ измерения. Система позволяет вычислять длительность различных форм поведения: горизонтальная активность (локомоции), неподвижность (иммобилизация), вертикальная активность (стойки), умывание (груминг) и прочие элементы системного поведения, включающие стереотипные движения и иные сложные формы поведенческой активности животных. Продолжительность эпохи анализа — 15 мин.

Анализ психоэмоционального состояния

Ультразвуковая вокализация (УЗВ) — издаваемые лабораторными животными высокочастотные колебания в ультразвуковом диапазоне, не слышимые человеком, свидетельствующие об эмоциональных и мотивационных изменениях животных и являющиеся их коммуникативной функцией. УЗВ регистрируется с помощью автоматизированной системы «Sonotrack» (Metris B.V., Нидерланды). Специальные микрофоны и оборудование устанавливаются дистанционно, на расстоянии 20–25 см от головы животных, и позволяют регистрировать сигнал частотой от 15 до 100 кГц и записывать его в цифровом формате для дальнейшей обработки. Частота дискретизации составляет 200 кГц. После удаления физических артефактов (монотонных шумов) осуществляется спектральный анализ ультразвука с использованием процедуры быстрого преобразования Фурье с помощью пакета программ MATLAB-5.5 методом Уэлча (функция `pwelch`). Эпоха анализа составляет 10 мс, размерность быстрого преобразования Фурье (Nfft) — 2000 интервалов. Значения спектральной

плотности мощности (СПМ) рассчитываются как отношение СПМ животного к фону окружающей среды (в процентах). После вычислений СПМ находятся медианы по каждой частоте, учитывая все эпохи анализа в эксперименте для каждого животного. Продолжительность эпохи анализа — 15 мин.

Статистический анализ

Статистическая обработка результатов эксперимента осуществлялась с использованием компьютерной программы «Statistica 10» (StatSoft Inc., США) с учётом t-критерия Стьюдента для парных выборок, для оценки статистической значимости изменений внутри группы при анализе УЗВ используется непараметрической критерий ANOVA.

Исследование безопасности ЛМК

Дозы, способы и длительность введения

В исследовании острой токсичности введение раствора липосом, содержащих комплекс биологически активных веществ, выделенных из мускуса кабарги, осуществляли в пяти возрастающих дозах по Литчфилду—Уилкоксона (500–2500–5000–7500–15000 мг/кг) внутрижелудочно зондово однократно [2]. Для исследования каждой дозы препарата использовались группы по 20 животных разного пола (10 самцов и 10 самок).

В исследовании субхронической токсичности введение препарата осуществляли транспалатинально (втиранием в нёбо) с помощью металлического медицинского шпателя в дозах 25 и 250 мг/кг 1 раз в сутки в течение 30 дней. В соответствии с методическими указаниями по изучению общетоксического действия фармакологических средств субхроническую токсичность вещества при его системном применении исследуют в нескольких дозах [3, 7]. Минимальная доза при изучении субхронической токсичности должна быть близка к терапевтической дозе [1, 6, 10]. На основании этого и с учётом

межвидового коэффициента пересчёта доз для крыс в качестве минимальной для изучения субхронической токсичности на крысах была выбрана доза 25 мг/кг в сутки (максимальная суточная доза для человека с учётом коэффициента пересчёта доз для крыс — 5,9). В качестве второй дозы выбрали дозу в 250 мг/кг в сутки, что в 10 раз превышает максимальную дозу для человека. Для исследования каждой дозы препарата использовались группы по 30 животных разного пола (15 самцов и 15 самок).

Животным контрольной группы вводили физ. р-р (0,9%-ный натрия хлорид) в объёме, соответствующем объёму препарата при максимальной дозе.

Период наблюдения и регистрируемые показатели

В исследовании острой токсичности период наблюдения составлял 14 сут. Регистрируемые показатели: летальность, время гибели животных, симптоматика отравления, ежедневное наблюдение общего состояния и поведения, взвешивание, вскрытие и макроскопическое описание погибавших и всех выживших животных в конце исследования (эвтаназия осуществлялась передозировкой эфира), определение массовых коэффициентов внутренних органов.

В исследовании субхронической токсичности период наблюдения составлял 30 сут. Общее состояние оценивалось при ежедневном осмотре животных. Взвешивание, измерение ректальной температуры, потребление воды и корма выполнялось один раз в неделю и после окончания эксперимента. Физиологические исследования проводились до начала, во время и в конце исследований. Гематологические и биохимические исследования проводились через 30 дней после начала исследования. Макроскопическое и гистологическое исследование внутренних органов проводились постмортально.

Методы оценки интоксикационного статуса животных

В исследовании безопасности тестируемого препарата оценивались клинико-токсикологические параметры (особенности поведения, состояние волосяного и кожного покрова, положение хвоста, количество и консистенция фекальных масс, частота мочеиспускания и др.), масса тела и внутренних органов, проводились макроскопические исследования (острая токсичность); в режиме субхронической токсичности дополнительно анализировались потребление корма и воды, ректальная температура, функция сердечно-сосудистой системы (систолическое артериальное давление и частота сердечных сокращений с помощью аппаратно-программного комплекса «Систола» (ООО «Нейроботикс», Россия) через 1 ч после введения препарата), функция нервной системы и поведение (с помощью системы «Laboras» (Metris B.V., Нидерланды) за период 30 мин), функция выделительной системы (рН мочи, плотность, качественное определение белка в моче на анализаторе мочи «URISIS 1100»), гематологические и биохимические параметры (биохимические показатели крови — АЛТ, АСТ, щелочная фосфатаза, общий белок, альбумин, холестерин, триглицериды — определяли на биохимическом анализаторе «ChemWell+» (США) с использованием реагентов фирмы «Spinreact» (Испания) в сыворотке крови из подключичной вены без следов гемолиза; гематологические исследования цельной крови выполнялись на гематологическом анализаторе «BC-3600» (Mindray); состояние свёртывающей системы крови оценивали на приборе «Thrombostat»); патоморфологические и гистологические параметры (забой убитых животных на 30-й день с помощью передозировки диэтиловым эфиром, ткани внутренних органов фиксировались в 10%-ном р-ре нейтрального формали-

на, после обезвоживания и заливки в парафин готовились гистологические срезы при помощи микротомы с последующим окрашиванием гематоксилин-эозином и по Ван-Гизону, срезы головного мозга окрашивали по Нисслю, исследования проводились с помощью цифровой микроскопии (микроскоп CX41 фирмы «Olimpus», Япония)), изучение местно-раздражающего действия (по состоянию слизистой оболочки полости рта после 30-дневного транспалатинального введения).

Статистический анализ

Статистическая обработка результатов эксперимента осуществлялась с использованием компьютерной программы «Statistica 10» (StatSoft Inc., США) с учётом t-критерия Стьюдента для парных выборок. Анализ данных для самцов и для самок проводился независимо, что позволяло не лимитировать себя априорно определённой моделью взаимодействия гендерного фактора с остальными.

Результаты и их обсуждение

Исследование эффективности ЛМК

Тест вынужденного плавания с грузом

Анализ результатов исследования (табл. 1) показал, что на фоне применения ЛМК в трёх тестируемых дозах отмечается повышение выносливости животных на всех этапах эксперимента. Максимальные показатели отмечаются на 14-й день курсового введения, достигая примерно одинаковых значений для доз 300 и 3000 мг — 29,8 и 30,5% соответственно. В два раза слабее действовала доза 1500 мг. Через 7 дней после прекращения её введения, по отношению к фоновым данным и сопоставимому результату контрольной группы, эффект отсутствовал. Наибольшие приросты отмечаются при дозе, эквивалентной 300 мг/чел., которая повышает работоспособность на 30% и сохраняет её на высоком уровне ещё в течение недели после окончания введе-

Таблица 1. Влияние курсового транспалатального введения липосом мускуса кабарги на время плавания животных, сек (среднее по группе)

Table 1. Effect of course transpalatal administration of musk deer liposomes on the swimming time of animals, sec (group average)

Период эксперимента / Доза (на чел.)	Фон	7-е сут	14-е сут	21-е сут
Контроль	89,8±4,2	92,2±5,1	93,8±2,6	93,2±6,8
300 мг	84,5±5,2	97,5±4,3*	110,3±3,3*	101,8±3,9*
1500 мг	86,5±2,7	95,8±2,2*	99,5±2,3*	89,7±3,7
3000 мг	83,8±5,8	95,8±2,2*	108,7±3,3*	104,2±2,2*

Примечание: * — достоверно по сравнению с фоновыми значениями при $p \leq 0,05$.

Note: * — statistically significant compared to the background values at $p < 0.05$.

Таблица 2. Влияние курсового транспалатального введения липосом мускуса кабарги на показатели работоспособности в кинезогидродинамической модели плавания

Table 2. Effect of course transpalatal administration of musk deer liposomes on performance indicators in a kinesi-hydrodynamic model of swimming

Период эксперимента	Группа / Показатель	Контроль	Липосомы мускуса
Фоновые данные	Среднее время плавания, сек	9,3±1,4	10,1±1,2
	Среднее количество заплывов	3,7±0,8	3,8±1,0
	Общее расстояние (работоспособность), м	22,4	24,6
7-е сут	Среднее время плавания, сек	9,2±2,1	15,8±2,0*
	Среднее количество заплывов	4,3±0,8	5,2±0,8
	Общее расстояние (работоспособность), м	26,3	45,1
14-е сут	Среднее время плавания, сек	10,7±2,2	18,9±2,1*
	Среднее количество заплывов	4,3±0,5	6,5±1,0*
	Общее расстояние (работоспособность), м	28,9	64,8
21-е сут	Среднее время плавания, сек	11,2±2,2	16,1±2,1*
	Среднее количество заплывов	3,8±0,8	5,8±0,8*
	Общее расстояние (работоспособность), м	26,4	51,6

Примечание: * — достоверно по сравнению с фоновыми значениями при $p \leq 0,05$.

Note: * — statistically significant compared to the background values at $p < 0.05$.

ния, в связи с чем принята в качестве оптимальной для дальнейших исследований.

Кинезогидродинамическая модель плавания

Анализ результатов исследования (табл. 2) обнаружил, что через 7 сут после начала введения ЛМК показатели выносливости и работоспособности возрастали в 1,2 и 1,7 раза соответственно, по сравнению с аналогичными показателями в контрольной группе, и на 34,8 и 83,3% — по отношению к фоновым значениям. На 14-е сут эксперимента повышение данных показателей продолжилось, составив 1,5 и 2,2 раза по отношению к контрольной группе животных, и, соответственно, 69,6 и 163,4% —

по сравнению с фоновыми показателями. Через 7 сут после прекращения введения ЛМК (21-е сут эксперимента) значения выносливости и работоспособности экспериментальной группы животных превосходили аналогичные контрольной группы в 1,5 и 2,0 раза, а по сравнению с фоновыми значениями — были выше на 52,6 и 109,8% соответственно.

Тест на ротороде

Анализ результатов исследования (табл. 3) показал, что введение ЛМК на 7-е сут увеличивает выносливость крыс в 2,6 раза, на 14-е сут эксперимента данный показатель увеличивается еще на 31,5%, а через неделю после прекраще-

ния введения, несмотря на снижение показателя на 32,3% по сравнению с 14-ми сут эксперимента, он превышал фоновые значения в 2,6 раза. Таким образом, обнаружено статистически достоверное повышение выносливости в тесте на ротароде через 7 сут ежедневного введения (156,5% по сравнению с фоновыми значениями), стабильное повышение показателя к 14-м сут, сохранение актопротекторного эффекта в течение 7 дней после прекращения введения.

Оценка свободного поведения

Анализ результатов исследования (табл. 4) показал, что в период эксперимента в динамике поведенческих форм контрольной группы животных отмечается повышение двигательной активности и ЭСП на фоне снижения длительности неподвиж-

ности и умывания. В динамике поведенческих форм опытной группы отмечаются противоположные эффекты: снижение двигательной активности и ЭСП на фоне повышения длительности неподвижности и умывания. Таким образом, введение ЛМК вызывает замедление локомоторной и ориентировочной-исследовательской деятельности и торможение центральной нервной системы в целом.

Анализ психоэмоционального состояния

Результаты исследований отражены на рис. 1–4.

Максимум СПМ УЗВ животных обеих групп в фоновых измерениях (рис. 1) обнаруживается в диапазоне 37–43 кГц, что свидетельствует о благоприятном (позитивном) психоэмоциональном состоянии животных.

Таблица 3. Влияние курсового транспалатального введения липосом мускуса кабарги на выносливость крыс в тесте на ротароде

Table 3. Effect of course transpalatal administration of musk deer liposomes on the endurance of rats in a rotarod test

Период эксперимента / Группа	Фон	7-е сут	14-е сут	21-е сут
Контроль	47,8±3,6	50,5±3,2	48,7±2,7	51,2±2,2
Липосомы мускуса	49,2±3,2	126,2±4,2*	141,7±2,7*	125,8±3,2*

Примечание: * — достоверно по сравнению с фоновыми значениями при $p \leq 0,05$.

Note: * — statistically significant compared to the background values $p < 0.05$.

Таблица 4. Влияние курсового транспалатального введения липосом мускуса кабарги на свободное поведение крыс

Table 4. Effect of course transpalatal administration of musk deer liposomes on the free behavior of rats

Период исследования	Длительность формы поведения (сек)				
	ЭСП	Г.а.	Им.	В.а.	Гр.
<i>Контроль</i>					
фон	88	9	382	58	363
7-й день	284	38	231	164	183
14-й день	267	31	285	114	203
21-й день	238	45	214	160	243
<i>Опыт</i>					
фон	374	67	26	272	161
7-й день	339	21	215	139	186
14-й день	265	26	253	135	221
21-й день	244	26	222	116	292

Примечание: ЭСП — элементы системного поведения, Г.а. — горизонтальная активность (локомоции), Им. — иммобилизация (неподвижность), В.а. — вертикальная активность (стойки), Гр. — груминг (умывание).

Note: ЭСП — elements of systemic behavior; Г.а. — horizontal activity (locomotion), Им. — immobility, В.а. — vertical activity (racks), Гр. — grooming (washing).

Картины УЗВ обеих экспериментальных групп (рис. 2) в этот период эксперимента также сходны, но несколько неоднозначны: отсутствуют явные максимумы спектральной мощности в каком-либо из информативных диапазонов, что может указывать на пограничное (переходное) эмоциональное состояние животных.

Максимум СПМ УЗВ (рис. 3) крыс контрольной группы на данном этапе исследования обнаруживается в диапазоне около 37–42 кГц. Дополнительные низкоамплитудные пики прослеживаются на частоте около 20 кГц, однако их спектральная мощность более чем на 20% ниже преобладающего диапазона, что свидетельствует о преимущественно комфортном психоэмоциональном состоянии животных.

Максимальная мощность УЗВ крыс опытной группы регистрируется в широком частотном диапазоне: около 40 и 23 кГц с разницей в спектральной мощности менее 20%, что отражает переходное (пограничное) состояние животных.

Оба графика УЗВ (рис. 4) не имеют выраженных экстремумов, интерпретация эмоционального статуса неоднозначна, состояние животных можно характеризовать как пограничное (смешанное).

Таким образом, изучение ультразвуковой вокализации контрольной и опытной групп животных выявило схожесть большинства анализируемых параметров в динамике эксперимента, что позволяет в целом судить о незначительном влиянии (в т. ч. отсутствии негативных эффектов) тестируемого препарата на психоэмоциональное состояние крыс.

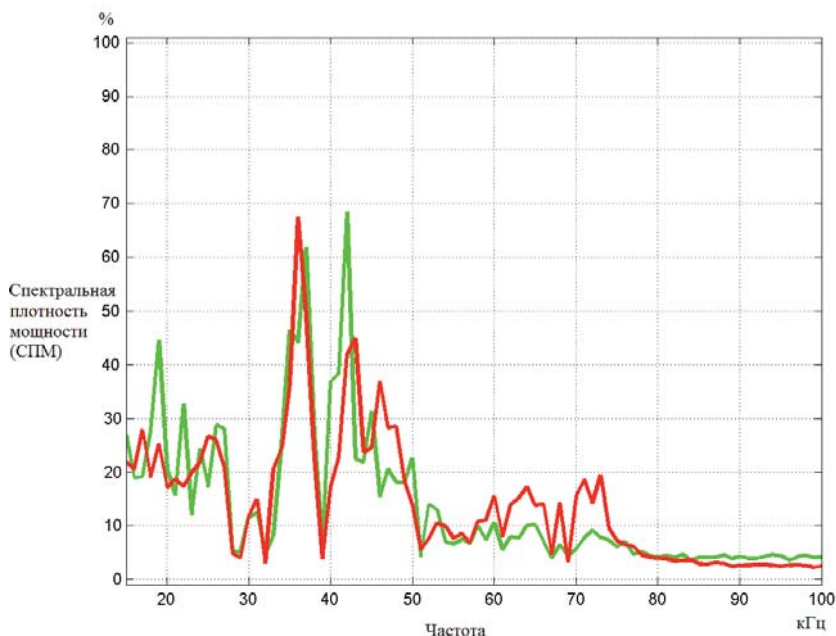


Рис. 1. УЗВ крыс в фоновых измерениях. По оси абсцисс — частота УЗВ, кГц. По оси ординат — спектральная плотность мощности (СПМ) УЗВ, %. Зелёная кривая — контрольная группа, красная кривая — опытная группа.
Fig. 1. Ultrasonic vocalization (USV) in rats in background measurements. The abscissa shows the USV frequency, kHz. The y-axis shows the power spectral density (PSD) of USV, %. The green curve is the control group, the red curve is the experimental group.

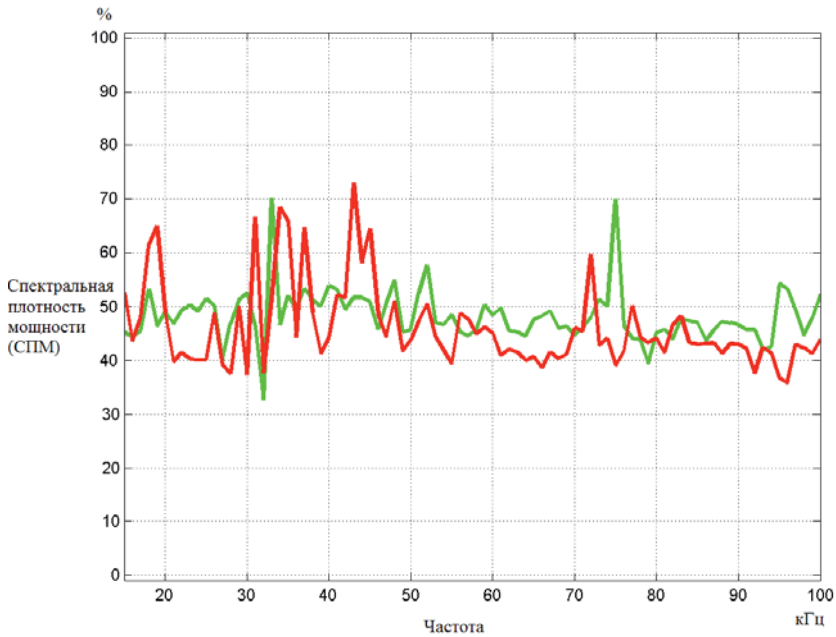


Рис. 2. УЗВ крыс в 7-й день эксперимента. Все обозначения — как на рис. 1.

Fig. 2. USV of rats on the 7th day of the experiment. All designations are similar to those in Fig. 1.

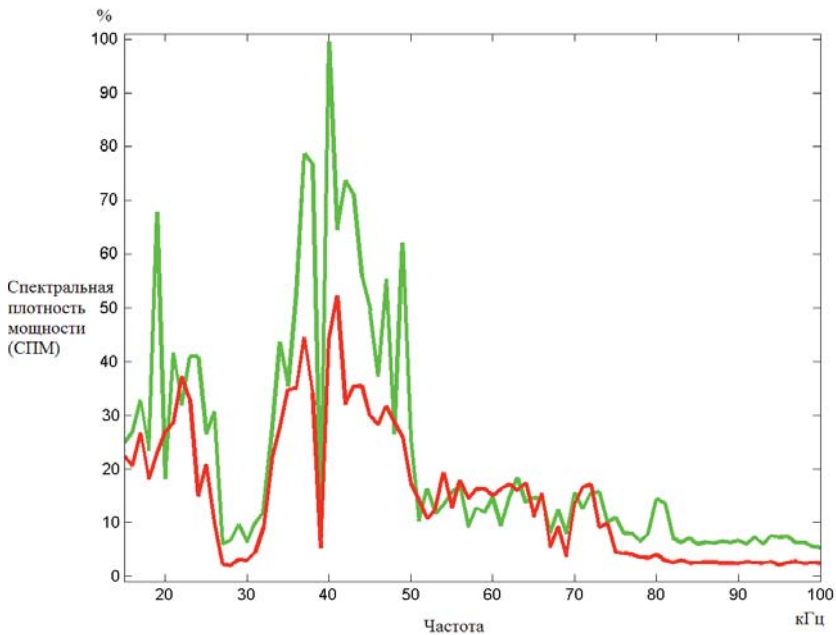


Рис. 3. УЗВ крыс в 14-й день эксперимента. Все обозначения — как на рис. 1.

Fig. 3. USV of rats on the 14th day of the experiment. All designations are similar to those in Fig. 1.

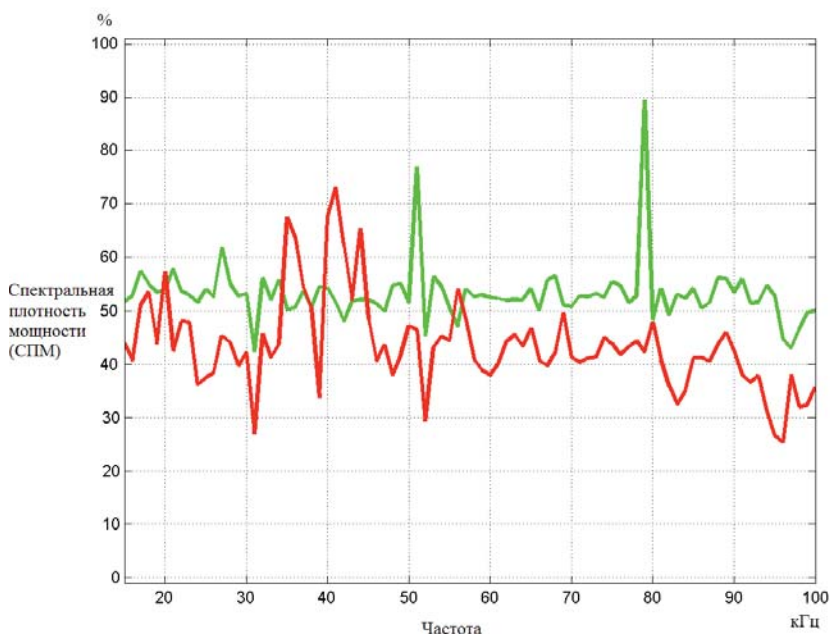


Рис. 4. УЗВ крыс в 21-й день эксперимента. Все обозначения — как на рис. 1.

Fig. 4. USV of rats on the 21st day of the experiment. All designations are similar to those in Fig. 1.

Исследование безопасности ЛМК

На основе токсиметрического исследования не выявлено летальных эффектов и, соответственно, не определены уровни летальных доз для мышей и крыс. Все животные удовлетворительно перенесли интоксикацию, и по окончании действия препарата признаков отсроченного влияния (продолгованной клинической интоксикации) не выявлено.

При исследовании острой токсичности на грызунах при внутрижелудочном пути введения тестируемого препарата выявить значения LD_{50} не представляется возможным. Максимальная доза исследуемого вещества по объёму введения для животных обоего пола составила 15000 мг/кг. Вскрытие животных спустя 14 дней после однократного введения препарата не показало наличия каких-либо остаточных явлений, связанных с перенесённой интоксикацией. Таким образом, полученные результаты по-

зволяют предположить, что исследуемый препарат на основе ЛМК имеет 6-ю степень токсичности (относительно безвредные препараты).

Проведёнными исследованиями по изучению субхронической токсичности при транспалатинальном способе введения ЛМК аутбредным крысам в дозах 25 и 250 мг/кг установлено, что введение тестируемого препарата подопытные животные перенесли одинаково хорошо, на протяжении всего исследования смертности выявлено не было. Из клинических признаков на протяжении всего исследования было отмечено незначительное снижение двигательной активности и мышечного тонуса у животных, получавших препарат в обеих дозах, по сравнению с контролем. Достоверных отличий в поведенческих реакциях между подопытными группами не было. Анализ данных по взвешиванию подопытных животных не выявил измене-

ний интенсивности прироста массы тела, тестируемый препарат не оказывает влияния на потребление корма и воды, температуру тела. Убедительного влияния исследуемого препарата на сердечно-сосудистую, нервную и выделительную систему, а также на гематологические и биохимические показатели не обнаружено. Патанатомическое исследование изменений в морфологическом и гистологическом строении внутренних органов и систем не выявило. Транспалатинальное введение препарата крысам не вызывало раздражения, воспаления или деструкции органов и тканей пищеварительной системы (слизистая оболочка ротовой полости розоватого цвета, блестящая, влажная, без гиперемии, эрозий, кровоизлияний), свидетельствующих о местно-раздражающем действии. Таким образом, полученные результаты исследования субхронической токсичности свидетельствуют об отсутствии негативного влияния препарата на интоксикационный статус животных.

Выводы

1. Липосомы мускуса, вводимые в дозах, эквивалентных 300, 1500 и 3000 мг/чел./сут, обладают актопротекторным действием, при этом его выраженность в дозе 300 мг сопоставима с таковой дозы 3000 мг, в связи с чем минимальная доза принята в качестве оптимальной для исследований эффективности.

2. Курсовое ежедневное транспалатинальное введение липосом мускуса кабарги в течение 14-ти сут статистически

достоверно повышает показатели физической выносливости и работоспособности крыс: в тесте вынужденного плавания с грузом отмечается прирост показателей на 27%, в кинезогидродинамической модели плавания — на 32%, в тесте на ротароде — на 186% по сравнению с фоновыми данными и сопоставимыми значениями контрольной группы. Повышение показателей сохраняется еще в течение 7-ми дней после прекращения введения препарата и составляет до 150%.

3. Курсовое ежедневное транспалатинальное введение липосом мускуса кабарги в течение 14-ти сут вызывает снижение локомоторной и ориентировочной-исследовательской активности (торможение ЦНС) и не оказывает убедительного, в т. ч. негативного, влияния на психоэмоциональный статус крыс.

4. Липосомы мускуса кабарги при курсовом транспалатинальном введении обладают способностью к фармакологической кумуляции.

5. Липосомированная лекарственная форма комплекса биологически активных веществ, выделенных из мускуса кабарги, имеет 6-ю степень токсичности (относительно безвредные препараты), значений LD_{50} при определении острой токсичности не обнаружено.

6. Исследования субхронической токсичности липосом мускуса кабарги свидетельствуют об отсутствии их отрицательного влияния на интоксикационный статус животных и местнораздражающего действия на пути введения.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ | REFERENCES

1. Белоусов Ю.Б., Зырянов С.К. Проблема эквивалентности оригинальных и воспроизведенных лекарственных средств с позиции клинического фармаколога. *Ведомости Научного центра экспертизы: средства медицинского применения*. 2007;1:12–17. [Belousov Yu.B., Zyryanov S.K. Problema ekvivalentnosti original'nyh i vosproizvedennyh lekarstvennyh sredstv s pozicii klinicheskogo farmakologa [The problem of equivalence of original and generic drugs from the point of view of a clinical pharmacologist]. *Vedomosti Nauchnogo centra ekspertizy: sredstva medicinskogo primeneniya* [Bulletin of the Scientific Center for Expertise: medical products]. 2007;1:12–17. (In Russian)].
2. Березовская И.В. Прогноз безопасности лекарственных средств в доклинических токсикологи-

- ческих исследованиях. *Токсикологический вестник*. 2010;5:17–22. [Berezovskaya I.V. Prognoz bezopasnosti lekarstvennykh sredstv v doklinicheskikh toksikologicheskikh issledovaniyakh [Prediction of drug safety in preclinical toxicological studies]. *Toksikologicheskii vestnik* [Toxicological Bulletin]. 2010;5:17–22. (In Russian)].
3. Голиков С.Н., Саноцкий И.В., Тиунов Л.А. *Общие механизмы токсического действия*. Л.: Медицина, 1986:280. [Golikov S.N., Sanotsky I.V., Tiunov L.A. *Obshchie mekhanizmy toksicheskogo dejstviya* [General mechanisms of toxic action]. Leningrad: Medicina Publ., 1986:280. (In Russian)].
4. Гуськова Т.А. *Токсикология лекарственных средств*. М.: Русский врач, 2003:154. [Guskova T.A. *Toksikologiya lekarstvennykh sredstv* [Toxicology of drugs]. Moscow: Russkij vrach Publ., 2003:154. (In Russian)].
5. Каркищенко Н.Н. *Альтернативы биомедицины. Т. 2. Классика и альтернативы фармакотоксикологии*. М.: Изд-во ВПК, 2007:448. [Karkischenko N.N. *Al'ternativy biomeditsiny. T. 2. Klassika i al'ternativy farmakotoksikologii* [Alternatives to biomedicine. Vol. 2. Classics and alternatives of pharmacotoxicology]. Moscow: VPK Publ., 2007:448. (In Russian)].
6. *Клиническая фармакология*. Под ред. акад. РАМН, проф. В.Г. Кукеса. М.: ГЭОТАР-Медиа, 2006:938. [Klinicheskaya farmakologiya [Clinical pharmacology]. Ed. by Acad. RAMS, Prof. V.G. Kukes. Moscow: GEOTAR-Media Publ., 2006:938. (In Russian)].
7. Красовский Г.Н., Рахманин Ю.А., Егорова Н.А. *Экстраполяция токсикологических данных с животных на человека*. М.: Медицина, 2009:208. [Krasovskiy G.N., Rakhmanin Yu.A., Egorova N.A. *Ekstrapolyaciya toksikologicheskikh dannykh s zhivotnykh na cheloveka* [Extrapolation of toxicological data from animals to humans]. Moscow: Medicina Publ., 2009:208. (In Russian)].
8. Кукес В.Г. Клинико-фармакологические подходы к повышению качества доклинических и клинических исследований новых лекарственных средств. *Ведомости Научного центра экспертизы средств медицинского применения*. 2006;1:7–10. [Kukes V.G. Kliniko-farmakologicheskie podhody k povysheniyu kachestva doklinicheskikh i klinicheskikh issledovaniy novykh lekarstvennykh sredstv [Clinical and pharmacological approaches to improving the quality of preclinical and clinical studies of new drugs]. *Vedomosti Nauchnogo centra ekspertizy sredstv medicinskogo primeneniya* [Bulletin of the Scientific Center for Expertise of Medicinal Products]. 2006;1:7–10. (In Russian)].
9. *Руководство по лабораторным животным и альтернативным моделям в биомедицинских исследованиях*. Под ред. Н.Н. Каркищенко и др. М.: Профиль-2С, 2010:358. [Rukovodstvo po laboratornym zhivotnym i al'ternativnym modelyam v biomeditsinskikh issledovaniyakh [Manual on laboratory animals and alternative models in biomedical research]. Ed. by N.N. Karkischenko, et al. Moscow: Profil'-2S Publ., 2010:358. (In Russian)].
10. Frank A. *Barile Clinical Toxicology. Principles, and Mechanisms*. London, New York, Washington: CRC Press, 2004:441.

СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ | INFORMATION ABOUT THE AUTHORS

Гасанов Мелик Тофикович*, к.м.н., доц., ФГБУН «Научный центр биомедицинских технологий ФМБА России»;
e-mail: m.gasanov@scbmt.ru

Melik T. Gasanov*, Cand. Sci. (Med.), Assoc. Prof., Scientific Center of Biomedical Technologies of the Federal Medical and Biological Agency of Russia;
e-mail: m.gasanov@scbmt.ru

Фокин Юрий Владимирович, к.б.н., ФГБУН «Научный центр биомедицинских технологий ФМБА России»;
e-mail: fokin@scbmt.ru

Yuriy V. Fokin, Cand. Sci. (Biol.), Scientific Center of Biomedical Technologies of the Federal Medical and Biological Agency of Russia;
e-mail: fokin@scbmt.ru

Люблинский Станислав Львович, к.б.н., ФГБУН «Научный центр биомедицинских технологий ФМБА России»;
e-mail: mobitek-m@mail.ru

Stanislav L. Lyublinskiy, Cand. Sci. (Biol.), Scientific Center of Biomedical Technologies of the Federal Medical and Biological Agency of Russia;
e-mail: mobitek-m@mail.ru

Алимкина Оксана Владимировна, ФГБУН
«Научный центр биомедицинских технологий
ФМБА России»;

e-mail: alimkina@scbmt.ru

Табоякова Лидия Александровна, ФГБУН
«Научный центр биомедицинских технологий
ФМБА России»;

e-mail: lida-vet@mail.ru

Каркищенко Владислав Николаевич, д.м.н.,
проф., ФГБУН «Научный центр биомедицин-
ских технологий ФМБА России»;

e-mail: scbmt@yandex.ru

Oksana V. Alimkina, Scientific Center of Bio-
medical Technologies of the Federal Medical and
Biological Agency of Russia;

e-mail: alimkina@scbmt.ru

Lidiya A. Taboyakova, Scientific Center of Bio-
medical Technologies of the Federal Medical and
Biological Agency of Russia;

e-mail: lida-vet@mail.ru

Vladislav N. Karkischenko, Dr. Sci. (Med.),
Prof., Scientific Center of Biomedical Technologies
of the Federal Medical and Biological Agency
of Russia;

e-mail: scbmt@yandex.ru

* Автор, ответственный за переписку / Corresponding author